

## 明 細 書

### ダンベル型DNAの効率的な製造方法

#### 技術分野

[0001] 本発明は、ダンベル型DNAの製造方法に関する。

#### 背景技術

[0002] ヒト・ゲノムプロジェクトの進歩により数多くの病因遺伝子が同定されるに伴い、「遺伝子」を薬として生体に導入することによって治療効果を期待する、いわゆる「遺伝子治療」が注目されるようになった(非特許文献1)。遺伝子治療を行うために、治療用遺伝子を治療する細胞に入れる仕掛けを「ベクター」と呼び、現在ではウイルスベクターとプラスミドベクターとが主に実際の臨床試験で用いられている。

[0003] ウイルスベクターは、通常病原性をなくしたウイルスなどを用いる。

この場合、ウイルスが細胞に感染して自分の遺伝子を細胞に送り込む働きを利用するので、他のベクターに比べてベクターの細胞への遺伝子導入効率が良いことが長所である。しかしながらウイルスベクターはごくまれに、病原性を無くし増殖できなくする前処理(不活化)を免れて、副作用として本来の病原性を表わしたり、勝手に増殖するウイルスが混じることがある。そのほか、予期しない遺伝子組み替えが起こりうること、免疫原性を持つことなども大きな問題となっている。

[0004] ウイルスベクターに比べ免疫原性は低く、生産性の高い代替ベクターとしてプラスミドDNA(pDNA)が近年特に注目されてきた。しかしながら最近の研究によると、プラスミドDNA中にCpG motifと呼ばれる配列が存在すると、マクロファージや樹状細胞がこれを取り込むと危険信号として認識し、種々の炎症性サイトカイン産生などの免疫活性化反応が起こることが明らかにされた。炎症性サイトカインは、その細胞毒性作用のため遺伝子発現を低下させてしまうため、遺伝子治療では不適切である。また、プラスミドDNAは通常、抗生物質耐性遺伝子や、微生物などの異種生物由来の余分な遺伝子配列を持ち、これらは遺伝子治療に不要なばかりでなく、それら遺伝子がコードする不要なタンパク質が発現する、正常なゲノムDNAに組み込まれるなどして異常ゲノムDNAができる、などの副作用の危険性がある(非特許文献2)。

- [0005] 米国特許第6451593号明細書には、最小限の免疫原性に限定した遺伝子発現(MIDGE; Minimalistic Immunogenically Defined Gene Expression)ベクター、つまりダンベル型DNAを使った遺伝子導入技術(MIDGE技術)が開示されている。このベクターは、RNA転写のもとになるDNAで、そのDNAは環状鎖DNAでできており、ダンベル型を形成する。このダンベル型ベクターは、環状鎖が最初の相補配列、最初の相補的でない配列、2番目の相補配列、2番目の相補的でない配列からできており、1番目と2番目の相補的配列のペアは2重鎖を形成し、これら2重鎖は、プロモーター配列、コード配列、ポリAまたは安定化配列を持ち、最初と2番目の相補的でない配列で1本鎖を形成するループ部分も持つ(特許文献1)。
- [0006] ウイルスベクターや、プラスミドベクターの欠点を補い長所を生かす、より優れた代替ベクターとしてダンベル型DNAベクターが作成された(非特許文献3)。ダンベル型DNAベクターは図1に示したように、プロモーターと転写配列領域しか含まず、余分な配列を持たないため免疫原性を最小限にすることができる。さらに必要な遺伝子配列の両端にそれぞれループ部分を持たせて閉じた環状DNAとすることで、細胞内に形質転換させた際に、Exonuclease(Exo型核酸分解酵素)活性を受けることなく、分解を受けにくく比較的血清や細胞内で安定であることが知られている。また、この遺伝子治療などに必要最低限の遺伝子配列しか持たないダンベルDNAを、図6に示したように3分子会合にて作るやりかたが知られている(非特許文献4)。図6に示してある一般的なダンベル型DNAの作成法では、目的の遺伝子配列を含むcDNAを鋳型DNAとして、PCR法にて直鎖状の目的DNA断片を増幅したのち(図6の工程1(PCR))、直鎖状の目的DNA断片の両端を制限酵素にて切断する。このものと、ダンベルのループ部分を持つ合成DNA2本とを、DNA ligaseを用いて結合させ、ダンベル型DNAとする方法を採用するのが一般的である。
- [0007] しかしながらこの作成法の欠点は、ライゲーション反応(図6の工程4(分子間ligation))が3分子会合によるものであり、しかも分子間ライゲーション反応であるので、ライゲーション効率が低い。加えて直鎖状の目的DNA断片のモル数に対して、ダンベルのループ部分を持つ合成DNA2本各々のモル数が大過剰必要であり、その結果殆ど全てのループ部分を持つ合成DNAが反応することなく無駄となり、これらは精

製の妨げにもなる。結果として、目的ダンベル型DNAの収量が非常に低くなっている。

[0008] 試験管内でのダンベル型DNAベクターを作る別のやり方として、図7に示したように、cDNAを鋳型DNAとして、2つの逆位の (inverted) N.Bpu10I ニック酵素認識配列を直鎖状の目的DNA断片の両端に持たせたものを作成し、大腸菌を用いて増幅可能なプラスミドベクターDNAにサブクローニングを行い、大腸菌に形質転換させ大量増幅させた後、図7の6-9の処理を行い目的配列を含むダンベル型DNAベクターを作成し、プラスミドベクター由来のダンベル型DNAを消化および精製するやり方が知られている。しかしながらこの作成法の欠点は、サブクローニングの必要があること、およびプラスミドベクター由来のダンベル型DNAを消化する必要があるなど、操作が非常に煩雑で時間を要する。

[0009] 特許文献1: 米国特許第6451593号明細書

[0010] 非特許文献1: Verma, I. M.; Somia, N. Nature 1997, 389, 239-242.

[0011] 非特許文献2: Luo, D.; Saltzman, W. M. Nat. Biotechnol. 2000, 18, 33-37. Ferber, D. Science 2001, 294, 1638-1642. Medzhitov, R. Nat. Immunol. 2001, 2, 15-16.

[0012] 非特許文献3: Schakowski, F.; Gorschluter, M.; Junghans, C.; Schroff, M.; Buttgereit, P.; Ziske, C.; Schottker, B.; Konig-Merediz, S. A.; Sauerbruch, T.; Wittig, B.; Schmidt-Wolf, I. G. Mol. Ther. 2001, 3, 793-800.

[0013] 非特許文献4: Zanta, M. A.; Belguise-Valladier, P.; Behr, J. P. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999, 96, 91-6.

## 発明の開示

### 発明が解決しようとする課題

[0014] 本発明は、ダンベル型DNAを製造するための簡易な方法を提供することを目的とする。

### 課題を解決するための手段

[0015] 従来法(3分子会合法、図6)でダンベル型DNAを作成したのではライゲーション効率が40%程度と非常に悪い(図3(B))。しかしながら、今回開発した新規手法(図1)にてダンベル型DNAを作成した場合、ライゲーションはほぼ定量的に進行した(図3(

A))。図2に示したように、ライゲーション反応を行う以前の化合物2cは、Exonuclease 処理 (37度1時間) によってほぼ完全に分解されてしまったが、ダンベル化の後の化合物4cはExonuclease耐性を持つに至った (安定性の向上)。

[0016] 2個のPCRプライマーのうち一方のループ部分にただ1箇所だけ蛍光基 (フルオレセイン) で化学修飾を行ったのちPCRを行った。PCR産物の直鎖状DNAに対し、本発明の方法でダンベル化を行い、ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分析を行った。ループ部分に1箇所だけ蛍光基を持つ修飾ダンベル型DNAは、図2に示したように exonuclease耐性を持ち安定性が向上した。

[0017] 図4に示したように、2個のPCRプライマーのうち一方のループ部分にただ1箇所だけアミノ基を持つプライマーを用いPCRを行った。PCR産物の直鎖状DNAに対し、本発明の方法でダンベル化を行い、1級アミノ基を1箇所のループ部分のみに持つダンベル型DNAを作成した。これに対しFluorescein-OSuを作用させ、ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分析を行った。約500bpのダンベルDNAのただ1箇所の1級アミノ基のみに部位特異的にフルオレセイン修飾されたことが分かった。ネガティブコントロール実験として、1級アミノ基をループ部分に全く持たない、同じ塩基配列を持つダンベル型DNAを用いて同一の実験を行ったが、DNAは蛍光修飾されなかった。

[0018] このように、ダンベル化のあとにループ部分特異的に化学修飾を行うことが可能となったが、この部位特異的修飾はニック酵素処理の前でも可能であった (データは示さず)。

例えば、siRNAを発現させるプロモーターとして利用される天然型のU6プロモーターの配列は240塩基から400塩基程度であり、天然のtRNAプロモーターの配列は100塩基から150塩基程度である。しかしながら、遺伝子導入に用いられるDNAは、細胞への透過性という面において、短いほど適していると考えられる。そこで、U6プロモーター配列を150塩基以下まで短くした場合において、実際に細胞への透過性を調べてみたところ、確かに短いDNA配列が短い場合には、細胞への透過性も高まった (図9(c))。このように小型化したプロモーター配列を用いることで、細胞内での発現量の増加が期待できる。また、導入するDNAの長さが150塩基対以下の場合、導入するDNAを合成化学的に生産することができる。

[0019] トランスフェクション試薬を用いずに、哺乳類の細胞内にダンベル型DNAベクターを導入(デリバリー)する手法として、ペプチドをダンベル型DNAのループ部分特異的に修飾した。ダンベル型DNA-ペプチド共有結合体に対し、制限酵素(EcoRI)処理を行い、ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分析を行った。各々のペプチドの分子量に依存して、別々の位置に分解断片が現れ、ダンベル型DNA-ペプチド共有結合体の形成が確認された。

[0020] 本発明は、これらの知見に基づいて、完成された。

[0021] 本発明の要旨は以下の通りである。

[1] 直鎖状2本鎖DNAの5'末端及び3'末端の両末端において、それぞれ、センス鎖とアンチセンス鎖がループ構造の一本鎖DNAで連結されているダンベル型DNAの製造方法であって、以下の工程：

1) センスプライマー及びアンチセンスプライマーを用いた核酸増幅法により、鋳型DNA中の目的のDNA配列を増幅する工程、ここで、センスプライマー及びアンチセンスプライマーは、それぞれ、5'末端に下記の(a)の配列を有し、かつ、5'末端側から3'末端側の方向に向かって順に下記の(b)の配列、(c)の配列及び(d)の配列を有し、

(a) ニック酵素の切断認識配列のセンス配列の一部であって、ニック酵素の作用によりニックが入る部位から3'末端側の配列を含む配列

(b) 一本鎖でループ構造を形成することができる配列

(c) (a)のニック酵素の切断認識配列のアンチセンス配列の全部

(d) 目的のDNA配列の全部又は一部に相補的な配列

2) 1)の工程で得られたDNA増幅産物を(a)のニック酵素で処理する工程、

3) 2)の工程でニック酵素処理されたDNA増幅産物を加熱し、その後にアニーリングする工程、及び

4) 3)の工程で加熱及びアニーリングされたDNA増幅産物をDNAリガーゼで処理する工程

を含み、ここで、

1)の工程で用いられるセンスプライマー及びアンチセンスプライマーの5'末端がリン

酸化されているか、あるいは1)の工程が行われた後4)の工程が行われる前にDNA増幅産物の5'末端がリン酸化される、前記方法。

[2] ダンベル型DNAが、RNA転写のためのベクターとして用いられるものである[1]記載の方法。

[3] 目的のDNA配列が1個以上のプロモーター配列及びsiRNA転写配列を有する[1]または[2]記載の方法。

[4] ダンベル型DNAがタンデム型siRNA発現ベクターあるいはステムループ型siRNA発現ベクターである[3]記載の方法。

[5] センスプライマー及び／又はアンチセンスプライマーが、さらに、第1のスペーサー配列及び第2のスペーサー配列を有し、ここで、第1のスペーサー配列及び第2のスペーサー配列は互いに相補的な配列であり、かつ、第1のスペーサー配列と第2のスペーサー配列とは(b)の配列を挟んで対向するように連結されている[1]〜[4]のいずれかに記載の方法。

[6] センスプライマー及びアンチセンスプライマーについて、(a)の配列が $TN^IAGG$  (配列中、Tはチミン、Aはアデニン、Gはグアニン、 $N^I$ はアデニン、シトシン、グアニンまたはチミンのいずれかである。)で表され、(b)の配列が $(T)_n$  (配列中、Tはチミンであり、nは1以上の整数である。)で表され、(c)の配列が $CCTN^{II}AGC$  (配列中、Cはシトシン、Tはチミン、Aはアデニン、Gはグアニン、 $N^{II}$ はアデニン、シトシン、グアニンまたはチミンのいずれかである。)で表される[1]〜[5]のいずれかに記載の方法。

[7] センスプライマー及びアンチセンスプライマーが、さらに、第1のスペーサー配列及び第2のスペーサー配列を有し、センスプライマーについて、第1のスペーサー配列がAGで表され、第2のスペーサー配列がTCで表され、アンチセンスプライマーについて、第1のスペーサー配列がTCで表され、第2のスペーサー配列がAGで表され、かつ、センスプライマー及びアンチセンスプライマーについて、第1のスペーサー配列と第2のスペーサー配列とは(b)の配列を挟んで対向するように連結されている[6]記載の方法。

[8] センスプライマーの配列及びアンチセンスプライマーについて、(b)の配列がTTTTで表される[7]記載の方法。

[9] センスプライマー及び／又はアンチセンスプライマーが、(b)の配列及び／又はスパーサー配列の核酸主鎖および塩基部分のうちの少なくとも1箇所で官能基により修飾されている[1]〜[8]のいずれかに記載の方法。

[10] 1)の工程の後に、官能基変換を行う工程をさらに含む[9]記載の方法。

[11] センスプライマー及びアンチセンスプライマーからなる少なくとも一組のプライマーを含む組成物であって、前記センスプライマー及び前記アンチセンスプライマーが、それぞれ、5'末端に下記の(a)の配列を有し、かつ、5'末端側から3'末端側の方向に向かって順に下記の(b)の配列、(c)の配列及び(d)の配列を有する、前記組成物。

(a) ニック酵素の切断認識配列のセンス配列の一部であって、ニック酵素の作用によりニックが入る部位から3'末端側の配列を含む配列

(b) 一本鎖でループ構造を形成することができる配列

(c) (a)のニック酵素の切断認識配列のアンチセンス配列の全部

(d) 目的のDNA配列の全部又は一部に相補的な配列

[12] 直鎖状2本鎖DNAの5'末端及び3'末端の両末端において、それぞれ、センス鎖とアンチセンス鎖がループ構造の一本鎖DNAで連結されているダンベル型DNAを製造するために用いられる[11]記載の組成物。

[13] 直鎖状2本鎖DNAの5'末端及び3'末端の両末端において、それぞれ、センス鎖とアンチセンス鎖がループ構造の一本鎖DNAで連結されているダンベル型DNAを製造するために用いられるキットであって、センスプライマー及びアンチセンスプライマーからなる少なくとも一組のプライマーを含み、前記センスプライマー及び前記アンチセンスプライマーが、それぞれ、5'末端に下記の(a)の配列を有し、かつ、5'末端側から3'末端側の方向に向かって順に下記の(b)の配列、(c)の配列及び(d)の配列を有する、前記キット。

(a) ニック酵素の切断認識配列のセンス配列の一部であって、ニック酵素の作用によりニックが入る部位から3'末端側の配列を含む配列

(b) 一本鎖でループ構造を形成することができる配列

(c) (a)のニック酵素の切断認識配列のアンチセンス配列の全部

(d) 目的のDNA配列の全部又は一部に相補的な配列

[14] 直鎖状2本鎖DNAの5'末端及び3'末端の両末端において、それぞれ、センス鎖とアンチセンス鎖がループ構造の一本鎖DNAで連結されているダンベル型DNAにデリバリー剤を結合させた核酸ベクターの製造方法であって、以下の工程:

1) センスプライマー及びアンチセンスプライマーを用いた核酸増幅法により、鋳型DNA中の目的のDNA配列を増幅する工程、ここで、センスプライマー及びアンチセンスプライマーは、それぞれ、5'末端に下記の(a)の配列を有し、かつ、5'末端側から3'末端側の方向に向かって順に下記の(b)の配列、(c)の配列及び(d)の配列を有し、

(a) ニック酵素の切断認識配列のセンス配列の一部であって、ニック酵素の作用によりニックが入る部位から3'末端側の配列を含む配列

(b) 一本鎖でループ構造を形成することができる配列

(c) (a)のニック酵素の切断認識配列のアンチセンス配列の全部

(d) 目的のDNA配列の全部又は一部に相補的な配列

2) 1)の工程で得られたDNA増幅産物を(a)のニック酵素で処理する工程、

3) 2)の工程でニック酵素処理されたDNA増幅産物を加熱し、その後にアニーリングする工程、

4) 3)の工程で加熱及びアニーリングされたDNA増幅産物をDNAリガーゼで処理する工程、及び

5) 4)の工程でDNAリガーゼ処理されたDNA増幅産物中の目的のDNA配列以外の配列にデリバリー剤を結合させる工程

を含み、ここで、

1)の工程で用いられるセンスプライマー及びアンチセンスプライマーの5'末端がリン酸化されているか、あるいは1)の工程が行われた後4)の工程が行われる前にDNA増幅産物の5'末端がリン酸化される、前記方法。

[15] [1]〜[10]のいずれかに記載の方法で作製されたダンベル型DNA。

[16] 直鎖状2本鎖DNAの5'末端及び3'末端の両末端において、それぞれ、センス鎖とアンチセンス鎖がループ構造の一本鎖DNAで連結されているダンベル型DNA



Aであって、以下の(a')〜(d')の配列を含む前記ダンベル型DNA。

(a') ニック酵素の切断認識配列のセンス配列の一部であって、ニック酵素の作用によりニックが入る部位から3'末端側の配列を含む配列

(b') 一本鎖でループ構造を形成することができる配列

(c') (a')のニック酵素の切断認識配列のアンチセンス配列の全部

(d') 目的のDNA配列

[17] 細胞あるいは組織に導入し、機能性核酸を細胞あるいは組織内で発現させることができる[15]または[16]記載のダンベル型DNA。

[18] 発現する機能性核酸がsiRNAあるいはヘアピンRNAを含む二本鎖RNAである[17]記載のダンベル型DNA。

[19] 発現する機能性核酸がリボザイムである[17]記載のダンベル型DNA。

[20] 発現する機能性核酸がアンチセンスRNAである[17]記載のダンベル型DNA

。

[21] RNAポリメラーゼIIIから転写されるプロモーター領域の全部又は一部を含む[17]〜[20]のいずれかに記載のダンベル型DNA。

[22] RNAポリメラーゼIIIから転写されるプロモーター領域の全部又は一部が、以下の(i)〜(iv)のうちの少なくとも1つの配列を含む250塩基以下の配列を含む[21]記載のダンベル型DNA。

(i)TATA

(ii)CTTACCGTAACTTGAAAGT

(iii)YYTCCCANNRNTNCNNYGCR

(iv)ATGCAAATあるいはこれに相補的な配列

(配列中、Rはグアニンまたはアデニンいずれかであり、Yはシトシンまたはチミンのいずれかであり、Nはグアニン、アデニン、シトシンまたはチミンのいずれかである。)

[23] RNAポリメラーゼIIIから転写されるプロモーター領域の全部又は一部が、以下の(i')〜(ii')のうちの少なくとも1つの配列を含む150塩基以下の配列を含む[21]記載のダンベル型DNA。

(i')RRYNNARYGG

(ii') GGTTCGANTCC

(配列中、Rはグアニンまたはアデニンいずれかであり、Yはシトシンまたはチミンのいずれかであり、Nはグアニン、アデニン、シトシンまたはチミンのいずれかである。)

[24] 配列番号1、22、23または25のいずれかの配列を含む[21]〜[23]のいずれかに記載のダンベル型DNA。

[25] 発現する機能性核酸の標的がウイルスあるいは癌に関連する遺伝子である[17]〜[24]のいずれかに記載のダンベル型DNA。

[26] ウイルスがHIV、HCVおよびHBVからなる群より選択される[25]記載のダンベル型DNA。

[27] 細胞あるいは組織に導入し、遺伝子の発現を抑制することができる[15]または[16]記載のダンベル型DNA。

[28] DNAザイムである[27]記載のダンベル型DNA。

[29] デコイとして作用する[27]記載のダンベル型DNA。

[30] ダンベル型DNAが光学活性なボラノホスフェートから製造された修飾型DNAである[15]〜[29]のいずれかに記載のダンベル型DNA。

[31] [15]〜[30]のいずれかに記載のダンベル型DNAを含む組成物。

[32] [15]〜[30]のいずれかに記載のダンベル型DNAを含む医薬組成物。

[0022] 本発明のダンベル型DNAの製造方法は、以下の利点を有する。

1)図7の従来法における、N.Bpu10Iサイトを4つ持つ、プラスミドベクターDNA構築の手間が不要である。

2)図7の従来法における、ベクターDNA由来の不要なダンベルDNAができない。

3)図6の従来法ではPCRプライマー(合成オリゴDNA)が4本必要なのに対し、図1の本発明の方法では合成オリゴ2本のみしか必要でなく、経済的である。

4)図1の本発明の方法では、環化してダンベル型DNAになるライゲーション反応が、分子内反応なので効率が非常に良く、図6の従来法と比較して量が取れる。

環化収率について、従来法(2本鎖DNAを基準として)40%程度であるが、本発明の方法だと80%以上となりえる。

つまり、図6の操作4において、ループ部分に官能基もしくは反応点を持つ合成オリゴDNAのわずか4%程度しかダンベル DNAにならず、残りの96%は無駄に廃棄される。

しかしながら、PCRに官能基もしくは反応点を持たせることで、原理的にはPCRプライマーの殆ど全てが消費され無駄にならず、ライゲーション反応も分子内反応なので、官能基もしくは反応点を持つ合成オリゴDNAの大部分(80~95%程度)がダンベル型DNAとなる。このように、上流および下流のPCRのプライマーの1本鎖ループ部分(図1の場合TTTTのどこか)のどちらか、または両方に官能基もしくは反応点を持たせる際に有利である。

5) 図1の操作2-5までは、全て同じチューブ内でのone-pot反応なので、操作が極めて簡便である。

6) PCR法で行う図6の従来法の場合では精製が2段階存在するのに対し、図1の本発明の方法の場合、精製が最後(操作6)だけでよい。精製ステップの省略は、ダンベル型DNAの全体での回収量低下を防ぐ。

[0023] 本明細書において、「ダンベル型DNA」とは、直鎖状2本鎖DNAの5'末端及び3'末端の両末端において、それぞれ、センス鎖とアンチセンス鎖をループ構造の一本鎖DNAで連結したDNAをいう。ダンベル型DNAを構成するDNAは、塩基部分、リン酸部分、糖部分、5'末端及び／又は3'末端が修飾されていても(修飾型DNA)、されていなくてもよい(天然型DNA)。

[0024] 修飾型DNAの種類及び製法は数々の文献に記載されている。例えば、リン酸部分のリンに結合している水酸基(-OH)が、ボラノ基(-BH<sub>3</sub>)、チオール基(-S-)、アミノ基(-NH<sub>2</sub>)、低級アルキル基(-R)(Rは、例えば、メチル基、エチル基など)およびアルコキシ基(-OR)(Rは、例えば、メチル基、エチル基など)からなる群より選択される基に置換されている修飾型DNAは、Biochemistry (1979) 18, 5134.; Tetrahedron Lett. (1982) 23, 4289.に記載されている。リン酸部分のリンに結合しているオキソ基(=O)が、チオキソ基(=S)に置換されている修飾型DNAは、Tetrahedron Lett. (1980) 21, 1121.; Biochemistry (1987) 26, 8237.に記載されている。リン酸部分のリンと糖の5'位

の炭素に結合しているオキシ基(-O-)が、メチレン基(-CH<sub>2</sub>-)、チオキシ基(-S-)およびアミノ基(-NH-)からなる群より選択される基に置換されている修飾型DNAは、Nucleic Acids Res. (1997) 25, 830に記載されている。リン酸部分のリンと糖の3'位の炭素に結合しているオキシ基(-O-)が、メチレン基(-CH<sub>2</sub>-)、チオキシ基(-S-)およびアミノ基(-NH-)からなる群より選択される基に置換されている修飾型DNAは、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1995) 92, 5798に記載されている。リン酸部分がホスホロジチオエート化されている修飾型DNAは、Tetrahedron Lett. (1988) 29, 2911.; JACS (1989) 111, 2321.に記載されている。

- [0025] 修飾塩基の例としては、2'-アミノプリン、2'-アミノプチリルピレン-ウリジン、2'-アミノウリジン、2'-デオキシウリジン、2'-フルオロ-シチジン、2'-フルオロ-ウリジン、2,6-ジアミノプリン、4-チオ-ウリジン、5-プロモ-ウリジン、5-フルオロ-シチジン、5-フルオロ-ウリジン、5-インド-ウリジン、5-メチル-シチジン、イノシン、N3-メチル-ウリジン、7-デアザ-グアニン、8-アミノヘキシル-アミノ-アデニン、6-チオ-グアニン、4-チオ-チミン、2-チオ-チミン、5-ヨード-ウリジン、5-ヨード-シチジン、8-プロモ-グアニン、8-プロモ-アデニン、7-デアザ-アデニン、7-デアザ-グアニン、8-オキソ-グアニン、5,6-ジヒドロ-ウリジン、5-ヒドロキシメチル-ウリジンなどを挙げることができるが、これらに限定されることはない。これらの合成ユニットは市販されており(例えば、Glen Research社から購入できる)、DNAへの導入は化学合成により可能である。
- [0026] 糖部分の修飾の例としては、3'-デオキシ化、2'-フルオロ化、アラバノシド化などを挙げることができるが、これらに限定されることはない。これらについてもDNAへの導入は化学合成により可能である。
- [0027] 5'末端の修飾の例としては、5'-アミノ化、5'-ビオチン化、5'-フルオレセイン化、5'-テトラフルオロ-フルオレセイン化、5'-チオ化、5'-ダブシル化などを挙げることができるが、これらに限定されることはない。
- [0028] 3'末端の修飾の例としては、3'-アミノ化、3'-ビオチン化、2,3-ジデオキシ化、3'-チオール化、3'-ダブシル化、3'-カルボキシレート化、3'-コレストリル化などを挙げることができるが、これらに限定されることはない。
- [0029] DNAの合成反応において、既存のDNAの一次構造が新たに合成されるDNAの

一次構造を決定するとき、既存のDNAを「鋳型DNA」という。

[0030] ニック酵素は、サイト及びストランド特異的な、人工的に工学的手法で作られたエンドヌクレアーゼである。

[0031] 「ニック」とは、エンドヌクレアーゼの作用により、二本鎖DNAの一方の鎖のホスホジエステル結合が開裂して5'にリン酸基、3'にヒドロキシル基を生ずるDNAの損傷のことである。この損傷は、DNAリガーゼにより修復可能な切断である。

[0032] 「ニック酵素の切断認識配列」とは、ニック酵素により認識されて、特定位置にニックが入るDNA配列をいう。

[0033] 「アニーリング」とは、二本鎖から一本鎖に解離したDNAを再び二本鎖DNAに会合させることをいう。二本鎖DNAの会合は、2つの分子間(すなわち、2本のDNA鎖間)で起こってもよいし、同一分子内(すなわち、1本のDNA鎖内)で生じてもよい。本発明のダンベル型DNAの製造方法においては、アニーリングにより、同一分子内で会合が生じて、新たな二本鎖DNA部分とループ部分が形成される。

[0034] 「プロモーター」とは、調節遺伝子の一種でRNAポリメラーゼが結合し、オペロンの転写を開始する部位のことである。

[0035] 「siRNA」とは、RNA干渉作用を有する(すなわち、標的とするmRNAを切断する活性を有する)短い二本鎖オリゴヌクレオチドをいう。標的とするmRNAを認識するRNA鎖はアンチセンス鎖であり、他方のRNA鎖がセンス鎖である。一般に、「アンチセンス鎖」とはmRNAが認識するRNA鎖である。siRNAの塩基数は、通常50個以下であり、好ましくは10〜40個であり、より好ましくは10〜30個である。siRNAは、RNA分子に限定されるわけではなく、RNA分子と他のヌクレオチド(例えば、DNAなど)とのキメラ分子であってもよく、また、これらの分子の置換体又は修飾体であってもよい。RNA及びDNA分子の置換体及び修飾体の例としては、5'末端を5'モノリン酸化したもの、3'末端の2'水酸基を2'-デオキシ、2'-O-メチル、ビオチン、2',3'-ダイデオキシシトシン、アミノプロピルホスホエステルに変えたものなどを挙げることができる。

[0036] 「siRNA転写配列」とは、siRNAをコードするDNA配列をいう。siRNA転写配列には、siRNAのセンス鎖をコードするDNA配列とsiRNAのアンチセンス鎖をコードするDNA配列の両方が含まれる。siRNA転写配列を組み込んだsiRNA発現ベクターにおいて

、2つのプロモーター配列の各々と機能的に連結した、siRNAのセンス鎖をコードするDNA配列とsiRNAのアンチセンス鎖をコードするDNA配列とが直列に結合しているものを「タンデム型siRNA発現ベクター」という(図8のa))。また、siRNAのセンス鎖をコードするDNA配列とsiRNAのアンチセンス鎖をコードするDNA配列とが随意的介在配列(例えば、一本鎖でループ構造を形成することができる配列など)を挟んで対向しているものがプロモーター配列と機能的に連結しているものを「ステムループ型siRNA発現ベクター」という(図8のa))。

- [0037] 「機能的に連結した」とは、プロモーターからの転写を受けて、siRNAのセンス鎖をコードするDNA配列及び／又はsiRNAのアンチセンス鎖をコードするDNA配列の転写産物が生成するように、該DNA配列とプロモーター配列とが結合していることをいう。従って、該DNA配列に対するプロモーター配列の位置は、その上流、下流を問わないが、通常上流に位置する。また、該DNA配列とプロモーター配列との間には、該DNA配列の転写が起こり得る限り、任意のDNA配列を有していてもよい。
- [0038] 「スペーサー配列」とは、ループ部分の一本鎖のヌクレオチド配列と、目的のDNA配列(プロモーター・転写・終結などに関わるヌクレオチド配列)との間にある、生化学的に意味を持たないオリゴヌクレオチド配列をいう。
- [0039] 「対向する」とは、互いに相補的な2つの配列を互いに逆方向となるように配置することを意味する。例えば、第1のスペーサー配列がAGで表され、第2のスペーサー配列がTCで表され、(b)の配列がTTTTで表される場合には、第1のスペーサー配列と第2のスペーサー配列とが(b)の配列を挟んで対向するように連結させると、AGTTTTCTの配列となる。
- [0040] 「核酸主鎖」とは、‘…糖-リン酸-糖-リン酸…’の基本骨格のことをいう。核酸主鎖は修飾がなされていても、なされていなくともよい。
- [0041] 「塩基部分」とは、核酸を構成するプリン又はピリミジン塩基の部分进行いう。プリン又はピリミジン塩基は修飾がなされていても、なされていなくともよい。
- [0042] 「デリバリー剤」とは、必要な量の薬を、体内の必要な場所または、必要な時間、およびその両方に正確に配達するための仕掛けを持つ各種分子をいう。
- [0043] 「機能性核酸」とは、細胞、組織、および器官において、特定の働きを持つ核酸を

いい、遺伝子発現抑制などの生理活性、RNAの切断などの酵素活性、タンパク質や、RNA、低分子化合物などへの結合能、などを有する核酸が含まれる。

[0044] 「ヘアピンRNA」とは、直鎖状2本鎖RNAの5'末端および3'末端の両末端同士が、1本鎖の構造を持つRNAループでつながったRNAをいい、ステム構造とそれをつなぐループ構造を持つステム、ループRNAが含まれる。ステム構造は、完全にマッチしていなくてもよい。

[0045] 「リボザイム」とは、RNAを化学的実体とする生体触媒の総称である。

[0046] 「アンチセンスRNA」とは、あるRNAと相補的な配列を持つRNA分子をいい、あるターゲットRNAと相補的に結合し、その発現を抑制するRNA分子を含む。

[0047] 「DNAザイム」とは、DNAを化学的実体とする生体触媒の総称である。

[0048] 「光学活性なボラノホスフェート」とは、デオキシヌクレオチドにおいて、ボラノ基が5'の $\alpha$ -リン原子に共有結合しているために生じる不斉中心を有するボラノホスフェートをいう。

[0049] なお、本明細書において、「ー」はその前後に記載される数値をそれぞれ最小値および最大値として含む範囲を示す。

[0050] 塩基配列の表示において、Aはアデニン、Cはシトシン、Gはグアニン、Tはチミン、Uはウラシル、Nはアデニン又はシトシン又はグアニン又はチミン若しくはウラシルのいずれかの塩基を表す。塩基配列は特にことわりがない限り、5'→3'方向に記載するものとする。

## 発明の効果

[0051] 本発明により、簡易な方法でダンベル型DNAを製造することができるようになった。

本明細書は、本願の優先権の基礎である日本国特許出願、特願2003-206905号の明細書および／または図面に記載される内容を包含する。

## 図面の簡単な説明

- [0052] [図1]本発明のダンベル型DNAの作成法の一例を示す。この手法は、特に上流および下流のPCRプライマーのループ部分(この場合TTTT配列の部分)のどちらかに1個、もしくはループ部分の両方に官能基を持たせる場合に有利である。原理的には全てのPCRプライマー(原料)が消費されるまでPCR反応は続くので、原料がほとんど無駄にならない。操作2)-3)までは全てone-pot反応(1つの試験管のなかへ次々と試薬を混ぜていくだけの反応)なので、操作が簡便なもの特徴である。1) 5'末端がリン酸化されている、Bpu10I制限酵素サイトの一部TNAGGと、1本鎖ループ部分の配列を挟んで第1のスペーサー配列と第2のスペーサー配列が対向するように連結している配列(NNTTTTNN; この図の場合はAGTTTTCTと、TCTTTTGA)と、Bpu10I制限酵素サイトのアンチセンス配列CCTNAGCを持つ2本の別々のプライマーを用いたPCRにより、cDNA中の目的の塩基配列(プロモーターおよび目的転写領域;例えばsiRNAコード領域))を増幅し、精製する。2) N.Bpu10I酵素を用いて、目的の塩基配列部分のみにニック(切れ目)を入れ、加熱し、徐冷して反応溶液を室温に戻し、ループを形成させる。3) DNAリガーゼを用いて分子内ライゲーション反応を行い、目的の1種類のみのダンベル型DNAを合成する。分子内ライゲーション反応なので、非常に高収率である。(図3(A))その後、DEAE イオン交換カラムやポリアクリルアミドゲル電気泳動、およびアガロース電気泳動などで、目的のDNA断片のみを精製する。
- [図2]エキソヌクレアーゼ消化に対するDNAの安定性を示す。バンドは最初、(a)フルオロイメジャー595によって可視化した。図1に書いてある、2cとか4cという化合物番号は、この図にも対応している。約600bpのバンドは、フルオレセインによって標識されたDNAである。次にゲルはエチジウムブロマイドによって染色され、バンドは、トランスイルミネータによって可視化された。
- [図3]直鎖状のベクターから、ダンベル型ベクターへの変換効率をあらわした図。ゲルはエチジウムブロマイドによって染色され、バンドは、トランスイルミネータによって可視化された。
- [図4]フルオレセインのスクシニミドエステルを用いた、ダンベル型DNAのループ特異的な修飾を示す。バンドは最初、(a)フルオロイメジャー595によって可視化した。次



にゲルはエチジウムブロマイドによって染色され、バンドは、トランスイルミネータによって可視化された。レーン1と2は、ヘアピンループ部分に一級アミノ基を持つダンベル型DNAを流し、レーン3と4は、ヘアピンループ部分に一級アミノ基を持たないダンベル型DNAを流した。レーン2と4は、フルオレセインスクシニミドエステルとの反応混合物サンプルを流した。レーン1と3は、その反応前のサンプルを流した。

[図5]HeLaS3/EGFP細胞内にトランスフェクションされた各種ベクターによる、EGFP発現抑制の様子を示す。

[図6]従来のダンベル型DNAの作成法の一つを示す。1. それぞれ独立の2個の制限酵素切断サイトを持つプライマーAおよびBを用いたPCRにより、cDNA中の目的の塩基配列(プロモーターおよび目的転写領域;例えばsiRNAコード領域))を増幅し、精製する。2. 別々の異なる制限酵素AおよびBで処理する。3. DEAE イオン交換カラムやポリアクリルアミドゲル電気泳動、およびアガロース電気泳動などで、目的のDNA断片のみを精製する。4. 目的のDNA断片に対して10倍当量過剰の、2種類の合成オリゴDNA(ループ部分)をまぜ、DNAリガーゼを用いて3分子会合し、ダンベル型DNAを合成する。分子間ライゲーション反応なので、低収率である。(図3(B)) 5. DEAE イオン交換カラムやポリアクリルアミドゲル電気泳動、およびアガロース電気泳動などで、目的のDNA断片のみを精製する。

[図7]従来のダンベル型DNAの別の作成法を示す。1. それぞれ独立の2個の制限酵素切断サイトを持ち、同時にBpu10I制限酵素サイトを2つ持つプライマーAおよびBを用いたPCRにより、cDNA中の目的の塩基配列(プロモーターおよび目的転写領域;例えばsiRNAコード領域))を増幅し、精製する。2. 別々の異なる制限酵素AおよびBで処理する。3. DEAE イオン交換カラムやポリアクリルアミドゲル電気泳動、およびアガロース電気泳動などで、目的のDNA断片のみを精製する。4. 大腸菌を用いて増幅可能なベクターDNA(MIDGEベクターなど)に、精製した目的DNA断片をDNAリガーゼなどを用いてクローニングする。5. 4を用いて大腸菌の形質転換を行い、目的DNA断片を持つプラスミドDNAを増幅する。6. N.Bpu10I酵素を用いて、目的の塩基配列部分のみにニック(切れ目)を入れる。7. 加熱する。8. 徐冷して反応溶液を室温に戻し、ループを形成させる。9. DNAリガーゼを用いて分子内ライゲ

ーション反応を行い、2種類のダンベル型DNAを合成する。10. 大腸菌を用いて増幅可能なベクターDNA (MIDGEベクターなど) 由来のダンベル型DNAを、制限酵素処理する。その際、目的DNA断片中にその制限酵素配列を持つてはならない。11. 制限酵素で部分消化したベクターDNA (MIDGEベクターなど) 由来のダンベル型DNAを、完全消化する。12. DEAE イオン交換カラムやポリアクリルアミドゲル電気泳動、およびアガロース電気泳動などで、目的のDNA断片のみを精製する。

[図8]タンデム型siRNA発現ベクター(a))とステムループ型siRNA発現ベクター(b))の一例を模式的に表した図である。a)のタンデム型siRNA発現ベクターでは、2つのU6プロモーターからセンスRNA、アンチセンスRNAが転写される。b)のステムループ型siRNA発現ベクターでは、ショートヘアピンRNAが転写され、プロセッシングを受けて、siRNAが産生される。

[図9]小型化プロモーターを導入したダンベル型ベクターの効果を示す。小型化プロモーターは天然のU6プロモーターとほぼ同程度の発現活性を有し((a))、小型化プロモーターで発現されるsiRNAはルシフェラーゼ遺伝子の発現を抑制する効果を有しており((b))、さらに、小型化プロモーターは天然のU6プロモーターよりも核透過性が高かった((c))。

### 発明を実施するための最良の形態

[0053] 以下、本発明を詳細に説明するが、これは、本発明の好ましい態様を説明するものであつて、本発明の範囲はこれに限定されるものではない。

#### [0054] 1. ダンベル型DNAの構築

##### 目的のDNA配列を有する鋳型DNAの構築

まず、目的のDNA配列を有する鋳型DNAを用意する。鋳型DNAとしては、cDNA、化学合成したDNA(一本鎖DNAの場合も、二本鎖DNAの場合もある)、PCRなどの生化学的手法により合成したDNA(一本鎖DNAの場合も、二本鎖DNAの場合もある)を例示することができる。鋳型DNAは、環状DNAであっても、直鎖状DNAであってもよい。

目的のDNA配列の長さは、20ー2000塩基であるとかよく、好ましくは40ー1000塩基であり、より好ましくは40ー500塩基である。

目的のDNA配列としては、プロモーター配列、目的とする転写領域の配列(例えば、siRNA転写配列、デコイ転写配列、非翻訳RNA転写配列(例えばマイクロRNA(miRNA) 転写配列、tRNA転写配列)、特定のタンパク質の翻訳に必要な配列、デコイ配列などを例示することができる。これらのDNA配列は、市販のDNA合成機などを用いて公知の方法で合成することができる。

プロモーターは、転写反応開始反応の効率に影響を与えるものであれば、特に限定されないが、本発明のダンベル型DNAをsiRNA発現ベクターとして用いる場合には、siRNAのような短いRNAの発現に適したpol III系を用いることが好ましい。

polIII系のプロモーターとしては、例えば、U6プロモーター、tRNAプロモーター、レトロウイルス性LTRプロモーター、アデノウイルスVA1プロモーター、5S rRNAプロモーター、7SK RNAプロモーター、7SL RNAプロモーター、H1 RNAプロモーターなどを挙げることができる。

利用可能なプロモーターの名前とその配列を以下に記載する。

・U6プロモーター

5'-AAGGTCG GGCAGGAAGA GGGCCTATTT CCCATGATTC CTTCATATTT  
GCATATACGA TACAAGGCTG TTAGAGAGAT AATTAGAATT AATTTGACTG  
TAAACACAAA GATATTAGTA CAAAATACGT GACGTAGAAA GTAATAATTT  
CTTGGGTAGT TTGCAGTTTT AAAATTATGT TTTAAAATGG ACTATCATAT  
GCTTACCGTA ACTTGAAAGT ATTTTCGATTT CTTGGCTTTA TATATCTT-3' (配列番号1)

天然のU6プロモーターには幾種類かの配列があり、後述の実施例2で用いたプロモーター配列(U6(240))は以下の通りである。

・U6(240)

5'-TTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTAGAGA  
GATAATTAGAATTAATTTGCCTGTAAACACAAAGATATTAGTACAAAATACG  
TGACGTAGAAAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTAAAATTATGTTT  
TAAAATGGACTATCATATGCTTACCGTAAGTATTTTCGATTTCTTG  
GCTTTATATATCTTGTGGAAAGGACGAAACACC-3' (配列番号25)

## ・H1 プロモーター

5'-AATATTTGCATGTCGCTATGTGTTCTGGGAAATCACCATAAACGTGAAAT  
GTCTTTGGATTTGGGAATCTTATAAGTTCTGTATGAGACCACAGATCGATCC  
CC-3' (配列番号2)

## ・tRNA プロモーター

5'-ACCGTTGGTTTCCGTAGTGTAGTGGTTATCACGTTTCGCCTAACACGCGAA  
AGGTCCCCGGTTCGAAACCGGGCACTACAAAAACCA-3' (配列番号3)

発現させるプロモーター領域を小型化した人工プロモーターを用いても良い。このような人工プロモーターとしては、RNAポリメラーゼIIIから転写されるプロモーター領域の全部又は一部を含み、以下の(i)～(iv)のうちの少なくとも1つの配列を含むものを挙げることができる。

(i) TATA

(ii) CTTACCGTAACTTGAAAGT

(iii) YYTCCCANRTNCNNYGCR

(iv) ATGCAAATあるいはこれに相補的な配列

(配列中、Rはグアニンまたはアデニンいずれかであり、Yはシトシンまたはチミンのいずれかであり、Nはグアニン、アデニン、シトシンまたはチミンのいずれかである。)

別の人工プロモーターとして、RNAポリメラーゼIIIから転写されるプロモーター領域の全部又は一部を含み、以下の(i')～(ii')のうちの少なくとも1つの配列を含むものを挙げることができる。

(i') RRYNNARYGG

(ii') GGTTCGANTCC

(配列中、Rはグアニンまたはアデニンいずれかであり、Yはシトシンまたはチミンのいずれかであり、Nはグアニン、アデニン、シトシンまたはチミンのいずれかである。)

人工プロモーターの塩基数は、250塩基以下であるとか、好ましくは150塩基以

下、より好ましくは100塩基以下である。

人工プロモーターとしては、後述の実施例に記載のU6(90)、U6(110)プロモーターなどを挙げることができる。U6(90)、U6(110)プロモーターの配列を以下に記載する。

・U6(90)プロモーター

5'-TTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTC  
GATTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAAGGACGAAACACC-3' (配列番号2  
2)

・U6(110)プロモーター

5'-TTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATAGGACTATCATATGCTTACCG  
TAACTTGAAAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAAGGACG  
AAACACC-3' (配列番号23)

また、プロモーターとして、誘導可能なプロモーターを用いることにより、所望のタイミングでsiRNAを発現させることも可能である。このような誘導可能なプロモーターとしては、テトラサイクリンで誘導可能なU6プロモーター (Ohkawa, J. & Taira, K. Control of the functional activity of an antisense RNA by a tetracycline-responsive derivative of the human U6 snRNA promoter. Hum Gene Ther. 11, 577-585 (2000)) 等が挙げられる。また、組織特異性のあるプロモーター、あるいはCre-LoxPシステムのようなDNA組み換えのシステムを用いて、組織特異的にsiRNAの発現を誘導してもよい。

プロモーター配列の長さは、1〜1500塩基であるとよく、好ましくは40〜500塩基であり、より好ましくは60〜260塩基である。

siRNA転写配列は、siRNAをコードするDNA配列であればよい。標的とする遺伝子(mRNA)は、遺伝病をはじめとする各種疾患の原因遺伝子、アポトーシス関連遺伝子(例えば、p53)、白血病遺伝子bcr-ablジャンクション、癌 ras, myx, met, mdm2, abl, erbBなどの疾患に関連する遺伝子、HIV、HCVなどの病原ウイルスのゲノムなどを例示することができる。

siRNA転写配列を開示している文献は以下の通りである。

c-JUNのsiRNA転写配列は、J Biol Chem. 2003 Jun 27 Disruption of the c-JUN-JNK complex by a cell-permeable peptide containing the c-JUN delta domain induces apoptosis and affects a distinct set of IL-1-induced inflammatory genes. Holzberg D, Knight CG, Dittrich-Breiholz O, Schneider H, Dorrie A, Hoffmann E, Resch K, Kracht M.に記載されている。

Chk1のsiRNA転写配列は、Mol Cancer Ther. 2003 Jun;2(6):543-8. Human chk1 expression is dispensable for somatic cell death and critical for sustaining g(2) DNA damage checkpoint. Chen Z, Xiao Z, Chen J, Ng SC, Sowin T, Sham H, Rosenberg S, Fesik S, Zhang H.に記載されている。

caspase 8のsiRNA転写配列は、Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Jun 16 Caspase 8 small interfering RNA prevents acute liver failure in mice. Zender L, Hutker S, Liedtke C, Tillmann HL, Zender S, Mundt B, Waltemathe M, Gosling T, Flemming P, Malek NP, Trautwein C, Manns MP, Kuhnel F, Kubicka S.; Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Jun 16 Caspase 8 small interfering RNA prevents acute liver failure in mice. Zender L, Hutker S, Liedtke C, Tillmann HL, Zender S, Mundt B, Waltemathe M, Gosling T, Flemming P, Malek NP, Trautwein C, Manns MP, Kuhnel F, Kubicka S.に記載されている。

RECKのsiRNA転写配列は、Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Jun 16 Caspase 8 small interfering RNA prevents acute liver failure in mice. Zender L, Hutker S, Liedtke C, Tillmann HL, Zender S, Mundt B, Waltemathe M, Gosling T, Flemming P, Malek NP, Trautwein C, Manns MP, Kuhnel F, Kubicka S.に記載されている。

STRADのsiRNA転写配列は、EMBO J. 2003 Jun 16;22(12):3062-3072. Activation of the tumour suppressor kinase LKB1 by the STE20-like pseudokinase STRAD. Baas AF, Boudeau J, Sapkota GP, Smit L, Medema R, Morrice NA, Alessi DR, Clevers HC.に記載されている。

PKA C $\alpha$ のsiRNA転写配列は、J Biol Chem. 2003 Jun 11 PKA blocks Raf-1 activity by stimulating 14-3-3 binding and blocking Raf-1 interaction with

Ras.Dumaz N, Marais R. に記載されている。

PKA C  $\beta$  のsiRNA転写配列は、J Biol Chem. 2003 Jun 11 PKA blocks Raf-1 activity by stimulating 14-3-3 binding and blocking Raf-1 interaction with Ras.

Dumaz N, Marais R.に記載されている。

ErbB3のsiRNA転写配列は、Oncogene. 2003 Jun 5;22(23):3598-607. Atypical expression of ErbB3 in myeloma cells: cross-talk between ErbB3 and the interferon-alpha signaling complex. Walters DK, French JD, Arendt BK, Jelinek DF. に記載されている。

Androgen ReceptorのsiRNA転写配列は、Mol Endocrinol 2003 May 29 Androgen Receptor Represses the Neuroendocrine Transdifferentiation Process in Prostate Cancer Cells. Wright ME, Tsai MJ, Aebersold R. に記載されている。

FADDのsiRNA転写配列は、J Biol Chem 2003 May 12 cFLIP-L inhibits p38 MAPK activation: An additional anti-apoptotic mechanism in bile acid-mediated apoptosis. Grambihler A, Higuchi H, Bronk SF, Gores GJ. に記載されている。

HB-EGFのsiRNA転写配列は、EMBO J 2003 May 15;22(10):2411-2421 TACE cleavage of proamphiregulin regulates GPCR-induced proliferation and motility of cancer cells. Gschwind A, Hart S, Fischer OM, Ullrich A.; EMBO J 2003 May 15;22(10):2411-2421 TACE cleavage of proamphiregulin regulates GPCR-induced proliferation and motility of cancer cells. Gschwind A, Hart S, Fischer OM, Ullrich A. に記載されている。

TACEのsiRNA転写配列は、EMBO J 2003 May 15;22(10):2411-2421 TACE cleavage of proamphiregulin regulates GPCR-induced proliferation and motility of cancer cells. Gschwind A, Hart S, Fischer OM, Ullrich A. に記載されている。

p73のsiRNA転写配列は、Cancer Cell 2003 Apr;3(4):403-10 Chemosensitivity linked to p73 function. Irwin MS, Kondo K, Marin MC, Cheng LS, Hahn WC, Kaelin WG. に記載されている。

$\beta$ -cateninのsiRNA転写配列は、Clin Cancer Res 2003 Apr;9(4):1291-300 Small Interfering RNAs Directed against beta-Catenin Inhibit the in Vitro and in Vivo

Growth of Colon Cancer Cells. Verma UN, Surabhi RM, Schmaltieg A, Becerra C, Gaynor RB. に記載されている。

APCのsiRNA転写配列は、Clin Cancer Res 2003 Apr;9(4):1291-300 Small Interfering RNAs Directed against beta-Catenin Inhibit the in Vitro and in Vivo Growth of Colon Cancer Cells. Verma UN, Surabhi RM, Schmaltieg A, Becerra C, Gaynor RB. に記載されている。

NF- $\kappa$ BのsiRNA転写配列は、Clin Cancer Res 2003 Apr;9(4):1291-300 Small Interfering RNAs Directed against beta-Catenin Inhibit the in Vitro and in Vivo Growth of Colon Cancer Cells. Verma UN, Surabhi RM, Schmaltieg A, Becerra C, Gaynor RB. に記載されている。

p120のsiRNA転写配列は、Gastroenterology 2003 Apr;124(4):949-60 Up-regulation, nuclear import, and tumor growth stimulation of the adhesion protein p120 in pancreatic cancer. Mayerle J, Friess H, Buchler MW, Schnekenburger J, Weiss FU, Zimmer KP, Domschke W, Lerch MM. に記載されている。

ATMのsiRNA転写配列は、Cancer Res 2003 Apr 1;63(7):1550-4 Enhanced Radiation and Chemotherapy-mediated Cell Killing of Human Cancer Cells by Small Inhibitory RNA Silencing of DNA Repair Factors. Collis SJ, Swartz MJ, Nelson WG, DeWeese TL. に記載されている。

ATRのsiRNA転写配列は、Cancer Res 2003 Apr 1;63(7):1550-4 Enhanced Radiation and Chemotherapy-mediated Cell Killing of Human Cancer Cells by Small Inhibitory RNA Silencing of DNA Repair Factors. Collis SJ, Swartz MJ, Nelson WG, DeWeese TL. に記載されている。

telomeraseのsiRNA転写配列は、Mol Cancer Ther 2003 Mar;2(3):209-16 Inhibition of telomerase activity in human cancer cells by RNA interference. Kosciolk BA, Kalantidis K, Tabler M, Rowley PT.; Mol Cancer Ther 2003 Mar;2(3):209-16 Inhibition of telomerase activity in human cancer cells by RNA interference. Kosciolk BA, Kalantidis K, Tabler M, Rowley PT. に記載されている。

cyclin GのsiRNA転写配列は、Oncogene 2003 Mar 20;22(11):1678-87 Modulation



of p53 and p73 levels by cyclin G: implication of a negative feedback regulation.

Ohtsuka T, Ryu H, Minamishima YA, Ryo A, Lee SW. に記載されている。

MDC1のsiRNA転写配列は、Nature 2003 Feb 27;421(6926):961-6 MDC1 is a mediator of the mammalian DNA damage checkpoint. Stewart GS, Wang B, Bignell CR, Taylor AM, Elledge SJ.; Nature 2003 Feb 27;421(6926):961-6 MDC1 is a mediator of the mammalian DNA damage checkpoint. Stewart GS, Wang B, Bignell CR, Taylor AM, Elledge SJ. に記載されている。

FasのsiRNA転写配列は、Nat Med 2003 Feb 10 RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. Song E, Lee SK, Wang J, Ince N, Ouyang N, Min J, Chen J, Shankar P, Lieberman J.; Nat Med 2003 Feb 10 RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. Song E, Lee SK, Wang J, Ince N, Ouyang N, Min J, Chen J, Shankar P, Lieberman J.; Nat Med 2003 Feb 10 RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. Song E, Lee SK, Wang J, Ince N, Ouyang N, Min J, Chen J, Shankar P, Lieberman J.; Nat Med 2003 Feb 10 RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. Song E, Lee SK, Wang J, Ince N, Ouyang N, Min J, Chen J, Shankar P, Lieberman J.; Nat Med 2003 Feb 10 RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. Song E, Lee SK, Wang J, Ince N, Ouyang N, Min J, Chen J, Shankar P, Lieberman J.; Nat Med 2003 Feb 10 RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. Song E, Lee SK, Wang J, Ince N, Ouyang N, Min J, Chen J, Shankar P, Lieberman J.; Nat Med 2003 Feb 10 RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. Song E, Lee SK, Wang J, Ince N, Ouyang N, Min J, Chen J, Shankar P, Lieberman J. に記載されている。

DNMT1のsiRNA転写配列は、Nat Genet 2002 Dec 23 DNMT1 is required to maintain CpG methylation and aberrant gene silencing in human cancer cells. Robert MF, Morin S, Beaulieu N, Gauthier F, Chute IC, Barsalou A, MacLeod AR. に記載されている。

DNA-PKcsのsiRNA転写配列は、Cancer Res 2002 Nov 15;62(22):6400-4 Silencing Expression of the Catalytic Subunit of DNA-dependent Protein Kinase by Small Interfering RNA Sensitizes Human Cells for Radiation-induced Chromosome

Damage, Cell Killing, and Mutation. Peng Y, Zhang Q, Nagasawa H, Okayasu R, Liber HL, Bedford JS. に記載されている。

p21Cip1/Waf1のsiRNA転写配列は、Genes Dev 2002 Nov 15;16(22):2923-34 Cdk4 disruption renders primary mouse cells resistant to oncogenic transformation, leading to Arf/p53-independent senescence. Zou X, Ray D, Aziyu A, Christov K, Boiko AD, Gudkov AV, Kiyokawa H. に記載されている。

EZH2のsiRNA転写配列は、Nature 2002 Oct 10;419(6907):624-9 The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. Varambally S, Dhanasekaran SM, Zhou M, Barrette TR, Kumar-Sinha C, Sanda MG, Ghosh D, Pienta KJ, Sewalt RG, Otte AP, Rubin MA, Chinnaiyan AMに記載されている。

p73のsiRNA転写配列は、Oncogene 2002 Jul 18;21(31):4715-27 p53 induces the expression of its antagonist p73 Delta N, establishing an autoregulatory feedback loop.

Kartasheva NN, Contente A, Lenz-Stoppler C, Roth J, Dobbelsstein に記載されている。

miRNAは、他の生体分子と相互作用して、発生や分化に影響する小さな非翻訳RNAである。miRNA転写配列は、miRNAをコードするDNA配列であればよい。miRNA転写配列は、Kawasaki H, Taira K., Hes1 is a target of microRNA-23 during retinoic-acid-induced neuronal differentiation of NT2 cells., Nature. 2003 年、423、838-842.などの文献に記載されている。

siRNAおよびmiRNA転写配列(プロモーター配列や、ループ部分の配列は含まないで、目的RNAに対する結合領域のみの配列)の長さは、1-200塩基であるとよく、好ましくは15-40塩基であり、より好ましくは18-25塩基である。

tRNA転写配列は、tRNAをコードするDNA配列であればよい。tRNA転写配列は、Koseki S, Tanabe T, Tani K, Asano S, Shioda T, Nagai Y, Shimada T, Ohkawa J, Taira K., Factors governing the activity in vivo of ribozymes transcribed by RNA polymerase III, J. Virol. 1999 Mar;73(3):1868-77.; Kawasaki H, Taira K. Short hairpin type of dsRNAs that are controlled by tRNA(Val) promoter significantly

induce RNAi-mediated gene silencing in the cytoplasm of human cells., Nucleic Acids Res. 2003年31、700-707ページ.などの文献に記載されている。tRNA転写配列の長さは、1-200塩基であるとよく、好ましくは65-110塩基であり、より好ましくは80-92塩基である。

特定のタンパク質の翻訳に必要な配列を開示している文献は以下の通りである。

Baxの翻訳に必要な配列は、Oltvai,Z.N., Milliman,C.L. and Korsmeyer,S.J., Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death, Cell 74 (4), 609-619 (1993).に記載されている。

p53の翻訳に必要な配列は、Harlow,E., Williamson,N.M., Ralston,R., Helfman,D.M. and Adams,T.E., Molecular cloning and in vitro expression of a cDNA clone for human cellular tumor antigen p53, Mol. Cell. Biol. 5 (7), 1601-1610 (1985)に記載されている。

特定のタンパク質の翻訳に必要な配列の長さは、1-2000塩基であるとよく、好ましくは50-1000塩基であり、より好ましくは65-800塩基である。

デコイ配列は、遺伝子の転写因子結合部位と同一の配列を持ち、これに転写因子が結合し、転写因子が本来のゲノム結合部位に結合することが阻害され、その結果、転写因子の発現が抑制されるものであれば、いかなるものであってもよい。

デコイ配列の一つを以下に記載する。

E2Fデコイ: TTTCGCGC

デコイ分子が結合することが知られている、E2F以外の転写因子(タンパク質)としては、AP-1、NF- $\kappa$ B、SSRE、CREB、MEF-2、CarG box、tax、VP16、TAR/tat、GRE/HRE/MRE、Heat shock RE、SRE、AP-2、sterol response element、TGF- $\beta$  responsive element、HIF-1などが知られている。

デコイ転写配列は、デコイ配列をコードする配列である(RNAデコイの場合)。また、デコイは転写因子のDNA結合部位の配列を含む、短いDNA2重鎖核酸(医薬)の場合もある。後者の場合、転写されることなく、ダンベル型DNA そのものが囫(デコイ)分子として働く。

目的のDNA配列を有するcDNAは、目的のDNA配列をプラスミド、ウイルス、また

はPCR産物などに組み込むことにより作製することができる。組み込みの方法は、J. Smabrook and D.W. Russell著、'Molecular Cloning'([www.MolecularCloning.com](http://www.MolecularCloning.com))などの文献に記載されている。

目的のDNA配列を有する鋳型DNAを化学合成するには、公知の方法に従えばよい。

[0055] 核酸増幅

センスプライマー及びアンチセンスプライマーを用いた核酸増幅法により、鋳型DNA中の目的のDNA配列を増幅する(図1の1))。ここで、センスプライマー及びアンチセンスプライマーは、それぞれ、5'末端に下記の(a)の配列を有し、かつ、5'末端側から3'末端側の方向に向かって順に下記の(b)の配列、(c)の配列及び(d)の配列を有する。

(a) ニック酵素の切断認識配列のセンス配列の一部であって、ニック酵素の作用によりニックが入る部位から3'末端側の配列を含む配列

(b) 一本鎖でループ構造を形成することができる配列

(c) (a)のニック酵素の切断認識配列のアンチセンス配列の全部

(d) 目的のDNA配列の全部又は一部に相補的な配列

(a)の配列の長さは、1〜10塩基であるとしてよく、好ましくは1〜7塩基であり、より好ましくは5塩基である。

(b)の長さは、1〜50塩基であるとしてよく、好ましくは1〜10塩基であり、より好ましくは3〜6塩基である。

(c)の長さは、4〜20塩基であるとしてよく、好ましくは5〜15塩基であり、より好ましくは7〜10塩基である。

(d)の長さは、5〜50塩基であるとしてよく、好ましくは10〜30塩基であり、より好ましくは15〜25塩基である。

ニック酵素は、二本鎖DNAの1本のストランドのみに開裂(ニック)を入れるものであるとよい。現在市販されている、二本鎖DNAの1本のストランドのみに開裂を入れるニック酵素及びその切断認識配列(制限酵素サイト)の例を以下に記載する。なお、

下記の配列は、ニック酵素により認識されてニックが入るストランドの配列(この場合、「ニック酵素の切断認識配列のセンス配列」)である。

Bpu10I制限酵素サイト: GCTNAGG (N. Bpu10Iニック酵素は、GC'TNAGGの配列を認識して'の位置にニックを入れる; Nは、ATGCのいずれの配列でも可能。

N.BpvC IB認識サイト: CCTCAGC(N.BpvC IBニック酵素は、CC'TCAGCの配列を認識して'の位置にニックを入れる)

N.BstNB I認識サイト: GAGTCNNNNN(N.BstNB Iニック酵素は、GAGTCNNNN'Nの配列を認識して'の位置にニックを入れる)

N.Alw I認識サイト:GGATCNNNNN(N.Alw Iニック酵素は、GGATCNNNN'Nの配列を認識して'の位置にニックを入れる)

N.BpvC IA 認識サイト: GCTGAGG (N.BpvC IA ニック酵素は、GC'TGAGG の配列を認識して'の位置にニックを入れる)

ニック酵素がN.Bpu10Iである場合、(a)の配列としてはTNAGGを、(c)の配列としてはCCTNAGCを挙げることができる。

ニック酵素がN.BpvC IBである場合、(a)の配列としてはTCAGCを、(c)の配列としてはGCTGAGGを挙げることができる。

ニック酵素がN.BstNB Iである場合、(a)の配列としてはNを、(c)の配列としてはNNNNNGACTCを挙げることができる。

ニック酵素がN.Alw Iである場合、(a)の配列としてはNを、(c)の配列としてはNNNNNGATCCを挙げることができる。

ニック酵素がN.BpvC IA である場合、(a)の配列としてはTGAGGを、(c)の配列としてはCCTCAGCを挙げることができる。

(b)の配列は、一本鎖でループ構造を形成することができるものであればいかなる配列であってもよく、その一例を以下に記載する。

(T)<sub>n</sub> (配列中、nは1以上、好ましくは1〜10であり、より好ましくは3〜6である。)

(b)の配列は、アダマーDNAの配列であってもよい。アダマーDNAの配列を以下に記載する。

・トロンビンに対するアダマー;GGNTGGN<sub>2-5</sub>GGNTGG(配列番号4〜7)

・色素 (Reactive Green 19) に結合するDNAアプタマーの配列モチーフ; 1本鎖ループを形成する。5'-ggcgttcgggggta-3' (配列番号8)

例えば、センスプライマー及びアンチセンスプライマーのうちの一方の(b)の配列をアプタマーDNAの配列とし、他方の(b)の配列を色素(例えば、 $\text{Eu}^{3+}$ 複合体(ユーロピウムなどの希土類色素と有機化合物との錯形成物)、Reactive Green 19など)で修飾してもよい。トロンビンのDNAアプタマー結合モチーフと目的タンパク質との融合タンパク質を細胞内で発現させた時に、 $\text{Eu}^{3+}$ 複合体色素-ダンベルDNAを細胞内に導入することで、結果として目的タンパク質が(希土類系)色素でラベルされる。遅延蛍光を利用した、細胞内で目的タンパク質の高感度測定を行うなどの応用が可能となる。センスプライマー及びアンチセンスプライマーのうちの一方の(b)の配列をアプタマーDNAの配列とし、他方の(b)の配列を色素で修飾したものから作製したダンベル型DNAは、アプタマー核酸を特異的に認識するペプチド又はタンパク質とin vitro及び/又はin vivoで結合させることにより、細胞内への導入が容易となる。

センスプライマー及び/又はアンチセンスプライマーは、さらに、第1のスペーサー配列及び第2のスペーサー配列を有してもよい。ここで、第1のスペーサー配列及び第2のスペーサー配列は互いに相補的な配列であり、かつ、第1のスペーサー配列と第2のスペーサー配列とは(b)の配列を挟んで対向するように連結される。

第1のスペーサーの例としてはAGを、第2のスペーサーの例としてはTCを挙げることができる。

ニック酵素としてN.Bpu10Iを使用する場合、センスプライマー及びアンチセンスプライマーについて、(a)の配列が $\text{TN}^1\text{AGG}$  (配列中、Tはチミン、Aはアデニン、Gはグアニン、 $\text{N}^1$ はアデニン、シトシン、グアニンまたはチミンのいずれかである。)で表され、(b)の配列が $(\text{T})_n$  (配列中、Tはチミンであり、nは1以上の整数である。)で表され、(c)の配列が $\text{CCTN}^{11}\text{AGC}$  (配列中、Cはシトシン、Tはチミン、Aはアデニン、Gはグアニン、 $\text{N}^{11}$ はアデニン、シトシン、グアニンまたはチミンのいずれかである。)で表されるとよい。(T)<sub>n</sub>のnは、1以上の整数であるが、好ましくは1-10のいずれかの整数であり、より好ましくは3-6のいずれかの整数である。センスプライマー及びアンチセンスプライマーは、さらに、第1のスペーサー配列及び第2のスペーサー配列を有し、センス

プライマーについて、第1のスペーサー配列がAGで表され、第2のスペーサー配列がTCで表され、アンチセンスプライマーについて、第1のスペーサー配列がTCで表され、第2のスペーサー配列がAGで表され、かつ、センスプライマー及びアンチセンスプライマーについて、第1のスペーサー配列と第2のスペーサー配列とは(b)の配列を挟んで対向するように連結されているとよい。

センスプライマーについて、(d)の配列は、目的のDNA配列のセンス鎖の5'末端を含む全部又は一部の領域の配列に相補的な配列を有する。

アンチセンスプライマーについて、(d)の配列は、目的のDNA配列のアンチセンス鎖の5'末端を含む全部又は一部の領域の配列に相補的な配列を有する。

センスプライマー及びアンチセンスプライマーの長さは、10〜200塩基であるとよく、好ましくは20〜150塩基であり、より好ましくは30〜120塩基である。

また、センスプライマー及び／又はアンチセンスプライマーは、(b)の配列及び／又はスペーサー配列の核酸主鎖および塩基部分のうちの少なくとも1箇所まで官能基により修飾されていてもよい。このような修飾がなされていると、これらのプライマーを用いて作製したダンベル型DNAにデリバリー剤などを結合させる反応点となるので有利である。修飾の例としては、アミノ基、フルオレセインなどの蛍光基、ビオチン基、などの官能基による修飾、タンパク質、ウイルス由来タンパク質、糖結合タンパク質、フェリチン、レクチン群、低密度リポタンパク質(LDL)、抗体、人工抗体、ペプチド、ペプチド疑似物、インスリン、ポリエチレングリコール、アミノ酸、非天然アミノ酸、アミノ酸および非天然アミノ酸の共重合体、ビオチン、レチノール、レチノール誘導体、糖、オリゴ糖、コレステロール、エストラジオール、エストロン、コレステロール誘導体、ステロイド、ホルモン、ステロイド誘導体、脂肪、ビタミン、葉酸などのデリバリー剤の結合などを挙げることができる。異なる官能基やデリバリー剤で複数の修飾を行ってもよい。導入された官能基を利用して、別の官能基、TATやNLSなどの機能性ペプチド、ガン細胞を特異的に認識する抗体、電子供与能を持つ蛍光又はリン光色素、電子受容能を持つ蛍光又はリン光色素、タンパク質、ウイルス由来タンパク質、糖結合タンパク質、フェリチン、レクチン群、低密度リポタンパク質(LDL)、抗体、人工抗体、ペプチド、ペプチド疑似物、インスリン、ポリエチレングリコール、アミノ酸、非天然アミノ酸、アミ

ノ酸および非天然アミノ酸の共重合体、ビオチン、レチノール、レチノール誘導体、糖、オリゴ糖、コレステロール、エストラジオール、エストロン、コレステロール誘導体、ステロイド、ホルモン、ステロイド誘導体、脂肪、ビタミン、葉酸などのデリバリー剤などの付加や置換をすることができる。

センスプライマー及びアンチセンスプライマーは、5'末端をリン酸化しておいてもよい。センスプライマー及びアンチセンスプライマーの5'末端をリン酸化しておけば、ダンベル型DNA構築の最終段階で、ヘアピンループ構造をとっているDNAにDNAリガーゼを作用させた時に、分子内ライゲーション反応によりDNAが環化する。5'末端のリン酸化は、DNA自動合成の最後の段階で、リン酸化試薬を結合させたのち、アンモニア処理で脱保護することにより行うことができる。また、化学合成したオリゴDNA(5'末端が水酸基)の場合は、T4 DNAリガーゼを用いて、酵素的にリン酸化することができる。

センスプライマー及びアンチセンスプライマーの5'末端をリン酸化しない場合には、これらのプライマーを用いた核酸増幅法により生成した増幅産物であるDNAにDNAリガーゼを作用させる前のいずれかの段階(例えば、核酸増幅の後、ニック酵素による処理の後、加熱の後、アニーリングの後など)で増幅産物DNAの5'末端をリン酸化しておくといよい。

センスプライマー及びアンチセンスプライマーを用いて、鋳型DNA中の目的のDNA配列を増幅するには、公知の核酸増幅法によればよい。例えば、センスプライマー及びアンチセンスプライマーを鋳型となるDNAと混合し、その後、DNAポリメラーゼを用いてPCRを行う。

#### [0056] 直鎖状DNAからダンベル型DNAへの変換

直鎖状DNA増幅産物をニック酵素と混合(例えば、DNA1  $\mu$ gに対してニック酵素0.5〜2Uの混合比で)し、反応混合物をインキュベーションする(例えば、25〜50℃で一晩)。この操作により、直鎖状DNA増幅産物(二本鎖DNA)の1本のストランドのみにニックが入る(図1の2a-cに付した矢印)。

その後、反応混合物を加熱し(例えば、90〜100℃で0.5〜10分)、室温まで1分〜2



時間かけて冷却する(アニーリング)。これらの操作により、直鎖状DNA増幅産物の末端部にヘアピンループ構造が形成される(図1の3a-c)。

次いで、DNAリガーゼ(例えば、DNA1  $\mu$ gに対してDNAリガーゼ175～1000Uの混合比で)とライゲーションバッファーを添加して、インキュベーションする(例えば、14～37℃で3分～6時間)。この操作により、ヘアピンループ構造部分で分子内ライゲーション反応が起こり、ダンベル型の構造が形成される。

以上の変換工程はワンポット反応である。すなわち、この変換工程は一つのマイクロチューブ内で行うことができる。

ダンベル型DNAの長さは、12～2000塩基(2重鎖相当分)であるとよく、好ましくは50～1000塩基(2重鎖相当分)であり、より好ましくは150～600塩基(2重鎖相当分)である。

ライゲーションにより生成した産物は公知の方法で精製するとよい。

上記の操作により、ダンベル型DNAが構築される。このとき、ダンベル型DNAは光学活性なボラノホスフェートから製造された修飾型DNAであってもよい。光学活性なボラノホスフェートから修飾型DNAを製造する方法は、Nucleic Acids Research, 1997, Vol.25, No.8, 1611-1617に記載されている。

## 2. エキソヌクレアーゼによる分解反応に対するダンベル型DNAの安定性の評価

1で構築したダンベル型DNAをエキソヌクレアーゼで、25～42℃の温度)で10分～2時間処理する。エキソヌクレアーゼ処理前後のダンベル型DNAを少量とって、電気泳動にかけ、バンドを可視化する。その結果、ダンベル型DNAはエキソヌクレアーゼによる分解反応に対して抵抗性を示すことがわかる。

## 3. ダンベル型DNAの部位特異的修飾

1で構築したダンベル型DNAは、公知の方法により、部位特異的修飾を行うことができる。例えば、特定位の塩基(例えば、一本鎖でループ構造を形成している配列中

の塩基)にアミノ基を導入しておけば、市販のAmine Labeling Kit (Panvera, Madison, WI)を用いることにより、アミノ基を導入した部位でダンベル型DNAをフルオレセインで修飾することができる。また、市販のキット(FastTag<sup>(R)</sup>, vector laboratories社)を用いて、無修飾のプライマーDNAにSH基を付与させておけば、各種マレイミド誘導体と反応させることができる。

#### 4. ダンベル型DNAへのデリバリー剤の結合

1で構築したダンベル型DNAは、公知の方法により、デリバリー剤を結合させることができる。

デリバリー剤としては、タンパク質、ウイルス由来タンパク質、糖結合タンパク質、フェリチン、レクチン群、低密度リポタンパク質(LDL)、抗体、人工抗体、ペプチド、ペプチド疑似物、インスリン、ポリエチレングリコール、アミノ酸、非天然アミノ酸、アミノ酸および非天然アミノ酸の共重合体、ビオチン、レチノール、レチノール誘導体、糖、オリゴ糖、コレステロール、エストラジオール、エストロン、コレステロール誘導体、ステロイド、ホルモン、ステロイド誘導体、脂肪、ビタミン、葉酸等を例示することができる。

ダンベル型DNAにデリバリー剤を結合させる方法の例を以下に記載する。第一の例では、まず、ダンベル型DNAにアミド基( $-\text{NH}_2$ )を導入し(ダンベル型DNA- $\text{NH}_2$ )、これをEMCS (6-Maleimidoheptanoic acid N-hydroxysuccinimide ester)と反応させることにより、ダンベル型DNAをマレイミド化することができる(ダンベル型DNA-NHCO-maleimide)。マレイミド化したダンベル型DNA(ダンベル型DNA-NHCO-maleimide)をペプチドなどに含まれるSH基と反応させることにより、ダンベル型DNAにペプチドを結合させることができる(ダンベル型DNA-NHCO-ペプチド)。

第二の例では、ダンベル型DNAにアミド基( $-\text{NH}_2$ )を導入し(ダンベルDNA- $\text{NH}_2$ )、これをスクシニミドエステル誘導体と反応させることにより、ダンベル型DNAを誘導体化することができる(ダンベル型DNA-NHCO-誘導体)。

## 5. ダンベル型DNAの利用

ダンベル型DNAは核酸ベクターとして利用することができる。

核酸ベクターの細胞への導入は、公知の方法で行うことができる。例えば、哺乳動物細胞への導入では、リン酸カルシウム法(Virology, Vol.52, p.456 (1973))、エレクトロポレーション法(Nucleic Acids Res., Vol.15, p.1311 (1987))、リポフェクション法(J. Clin. Biochem. Nutr., Vol.7, p.175 (1989))、ウイルスにより感染導入方法(Sci.Am., p.34, March (1994))、ジーンガンなどから選択することができ、植物細胞への導入では、エレクトロポレーション法(Nature, Vol.319, p.791 (1986))、ポリエチレングリコール法(EMBO J., Vol.3, p.2717 (1984))、パーティクルガン法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.85, p.8502 (1988))、アグロバクテリウムを介した方法(Nucleic Acids Res., Vol.12, p.8711 (1984)) 等により行うことができる。

核酸ベクターが導入された細胞を選択する方法としては、導入した核酸ベクターに特異的なDNA配列をプローブあるいはプライマーとして、ハイブリダイゼーション、PCR法等の公知の手法により選択することができる。核酸ベクターが選択マーカーを備えている場合には、その選択マーカーによる表現型を指標に選択することができる。

ダンベル型DNA、又はデリバリー剤を結合させたダンベル型DNAがsiRNA転写配列を有する場合には、そのsiRNAが標的とする遺伝子(mRNA)の発現を抑制することができるので、疾患の予防及び／又は治療を目的とする医薬品として、あるいは、遺伝子の機能を解析するための試薬として利用することができる。例えば、siRNAが標的とする遺伝子が、遺伝病をはじめとする各種疾患の原因遺伝子、アポトーシス関連遺伝子(例えば、p53)、白血病遺伝子bcr-ablジャンクション、癌 ras, myx, met, mdm2, abl, erbBなどの疾患に関連する遺伝子、HIV、HCVなどの病原ウイルスのゲノムなどである場合には、ダンベル型DNA、又はデリバリー剤を結合させたダンベル型DNAは、疾患を予防及び／又は治療するための医薬品として、ヒト、その他の動物に投与することができる。

患者の組織または細胞に、siRNA配列を有するダンベル型DNA、又はデリバリー

剤を結合させたダンベル型DNAを導入することによって、細胞中の標的遺伝子の発現を抑制することができる。ダンベル型DNA、又はデリバリー剤を結合させたダンベル型DNAの導入は、例えば、それらをリポソームに封入し、細胞内に取り込む方法(“Lipidic vector systems for gene transfer”(1997) R.J. Lee and L. Huang Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst 14, 173-206; 中西守ら、蛋白質 核酸 酵素 Vol.44, No.11, 1590-1596 (1999))、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法、リポフェクション法、マイクロインジェクション法、遺伝子銃による方法などで行うことができる。ダンベル型DNA、又はデリバリー剤を結合させたダンベル型DNAを細胞に導入する場合には、例えば、疾患部位の細胞を一部取り出し、in vitroで遺伝子導入を行った後、該細胞を再び組織に戻すことも可能であるし、あるいは、疾患部の組織に導入することもできる。

ダンベル型DNA、又はデリバリー剤を結合させたダンベル型DNAを有効成分として含む医薬組成物は、必要により、医薬上許容される担体(例えば、生理食塩水、緩衝液などの希釈剤)を含むことができる。投与は、疾病の状態の重篤度や生体の応答性によるが、治療の有効性が認められるまで、あるいは疾病状態の軽減が達成されるまでの期間にわたり、適当な用量、投与方法、頻度で行えばよい。

本発明のダンベル型DNAを用いて、siRNAあるいはヘアピンRNAを含む二本鎖RNA、リボザイム、アンチセンスRNAなどの機能性核酸を細胞あるいは組織内で発現させたり、遺伝子の発現を抑制することができる。機能性核酸の標的は、HIV、HCV、HBVなどのウイルス、癌遺伝子などであるといふ。本発明のダンベル型DNAを細胞あるいは組織内に導入したときに、遺伝子の発現を抑制することができれば、このダンベル型DNAはDNAザイムとして利用することができる。

本発明のダンベル型DNAを含む組成物は、医薬品、化粧品、試薬、食品などの種々の用途に利用することができる。

## 6. プライマー組成物及びキット

本発明の別の態様として、上記のセンスプライマー及びアンチセンスプライマーからなる少なくとも1組のプライマーを含むキットが提供される。このキットは、ダンベル型

DNAを製造するために利用することができる。キットは、上記のセンスプライマー及びアンチセンスプライマーからなる少なくとも1組のプライマー以外の要素を含んでもよい。例えば、核酸増幅の鋳型となるDNA、DNAポリメラーゼ、各種塩基のdNTP、ニック酵素、DNAリガーゼ、バッファー（例えば、トリスバッファー、リン酸バッファー、カコジル酸バッファーなど）、キットの使用方法を記載した説明書、コバルト塩、マグネシウム塩、マンガン塩、更なる官能基化のできる化合物（マレイミド誘導体、スクシニミドエステル誘導体、機能性ペプチド、反応点を持つタンパク質や抗体）などを含んでもよい。

## 実施例

[0057] 以下、本発明を実施例によって具体的に説明する。なお、これらの実施例は、本発明を説明するためのものであって、本発明の範囲を限定するものではない。

### [実施例1]

#### 実験方法

本実験の全般に渡り、全ての溶媒と試薬は市販の物を使い、特に精製を行っていない。アッセーは最低3回行った。

プラスミド構築. pU6i-EGFP と pU6i-lamin プラスミドは、U6 promoter と、enhanced green fluorescent protein (EGFP) と laminにそれぞれ対するhairpin-type siRNA 発現配列とを持つ。それらは、次のように構築した。最初に本発明者らはsiRNA 発現ベクターを、市販の pU6icassette vector (iGENE Therapeutics, Tsukuba, Japan)をもとに構築した。この市販ベクターは、human U6 promoter と2つの BspMI サイトを持つ。siRNA-発現ベクター構築のために、本発明者らは hairpin 配列, terminator 配列, そして overhanging 配列を持つオリゴヌクレオチドを(外注で)合成した。そして、それらフラグメントのアニールを行い、先ほどのpU6icassetteベクターBspMI サイトに挿入(

ライゲーション)を行った。

U6 プロモーター直後の挿入配列は次の通り: pU6i-EGFPでは; 5'-GGC TAT GTC TAG GAG TGT ACC TAG AAT TAC ATC AAG GGA GAT GGT GCG CTC CTG GAC GTA GCC-3' (配列番号9), pU6i-laminでは; 5'-GGG TAA TTG GTA GAT TAA GCG GTG TGC TGT CCC GCT TGA TCT GCC AAT TGC CC-3' (配列番号10)

3つの独立したオリゴヌクレオチドを用いて分子間でダンベル型DNAを作る従来法.

(a) U6 promoter-によって発生する siRNA をコードする直鎖状 DNAの PCRによる増幅: 500 pmol のそれぞれの合成DNAプライマーをpU6i-lamin ベクターとまぜ、PCR 反応を Ex Taq<sup>TM</sup> DNA polymerase (TaKaRa, Shiga, Japan).を使って行った。PCRのためのプライマーの、センスおよびアンチセンス鎖の配列は、5'-pGGG AAT TCA CCT GCC GGC GAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC GTT G-3' (配列番号11)と 5'-pGGC TGC AGA CCT GCC GGC CAC CGA GCG GAT AAC AAT TTC ACA CAG G-3' (配列番号12)である。どちらのプライマーも BspMI 認識配列(下線で示してある),を持ち、5'-末端はリン酸化されている。PCR 産物は Wizard<sup>(R)</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA)を用いることで精製され、BspMIを用いて消化された。37 度で7時間反応を行ったのち、消化された生成物は Wizard<sup>(R)</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)にて単離された。

(b) siRNA発現用直鎖状 DNA のダンベル型 DNAへの変換: ダンベル化されていない PCR 産物は、T4 DNA ligase (DNA ligation kit; TaKaRa)を用いて、10当量過剰のoligonucleotide-cap分子と反応し、ダンベル化した。ライゲーション反応前に、粘着性5' 末端を持つoligonucleotide-capのヘアピン型構造を持つDNAを、95 度で1分処理後、1 時間かけて徐々にそれを室温に徐冷することで得た。

oligonucleotide-capの配列は、5'-pGGT GTG TCC GCG TTG GCT TTT GCC AAC GCG GAC A-3' (配列番号13)と 5'-pCCT CGG CCT ATA GTG AGT CGT ATT AGG CGG GAA CCG CCT AAT ACG ACT CAC TAT AGG CC-3' (配列番号14)である。反応混合物は、16 度、終夜インキュベートを行い、ライゲーション産物

は phenol/chloroform抽出後、エタノール沈殿を行うことで得た。

PCR産物の分子内ライゲーションによるダンベルDNA ベクターの新規作成法.

(1) U6 promoter-によって発生する、laminに対する siRNA をコードする直鎖状 DNA のPCR による増幅: それぞれの合成DNAプライマーを500 pmol ずつ、pU6i-laminベクターと混合し、PCR 反応を Ex Taq™ DNA polymerase (TaKaRa, Shiga, Japan).を使って行った。PCRのための共通プライマーの、センスおよびアンチセンス鎖の配列は、5'-pTTA GGA GTT X<sup>n</sup>TC TCC TAA GCG TTT TCC CAG TCA CGA CGT TG-3' (n=1-3) (配列番号15-17) 及び5'-pTTA GGT CTT TTG ACC TAA GCG AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GG-3' (配列番号18) である。どちらのプライマーも N.Bpu10I認識配列(下線で示してある)を持ち、5'-末端はリン酸化されている。PCR 産物は Wizard<sup>(R)</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA)を用いることで精製された。センスプライマーは、未修飾の (X<sup>1</sup>; dT), アミノ基で修飾された (X<sup>2</sup>, amino-modified dT), またはフルオレセインで修飾された (X<sup>3</sup>, fluorescein-modified dT) デオキシチミジンである。それらHPLCで精製済みの共プライマーはHokkaido System Science Co., Ltd. (Sapporo, Japan)から購入した。

(2) U6 promoter-によって発生する、EGFPに対する siRNA をコードする直鎖状 DNA のPCR による増幅: 500 pmol の各々の合成DNAプライマーとpU6i-EGFPプラスミドDNAとを混ぜ、最初の PCR 反応を Ex Taq™ DNA polymerase (TaKaRa, Shiga, Japan).を使って行った。最初のPCRのためのプライマーの、センスおよびアンチセンス鎖の配列は、5'-GTT TTC CCA GTC ACG ACG TTG AAG GTC GGG CAG GAA GAG-3' (配列番号19)と 5'-GAG CGG ATA ACA ATT TCA CAC AGG AAA AAG GCT ACG TCC AGG AG-3' (配列番号20)である。そして、最初のPCR生成物は、8%ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて精製された。単離したPCRフラグメントを鋳型 DNAとして、2番目の PCR 反応を共通プライマーを用いて同一条件にて行った。2番目のPCR 産物は Wizard<sup>(R)</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA)を用いることで精製された。

siRNA をコードする直鎖状DNAの塩基配列は以下の通りである。

TTAGGAGTTTTCTCCTAAGCGTTTTCCCAGTCACGACGTTGAAGGTCGGGC  
AGGAAGAGGGCCTATTTTCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAA  
GGCTGTTAGAGAGATAATTAGAATTAATTTGACTGTAAACACAAAGATATTA  
GTACAAAATACGTGACGTAGAAAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTT  
TAAAATTATGTTTTAAATGGACTATCATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTAT  
TTCGATTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCGGCTATG  
TCTAGGAGTGACCTAGAATTACATCAAGGGAGATGGTGCGCTCCTGGACG  
TAGCCTTTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCGCTTAGGTCAAAGACCT  
AA(配列番号21)

(3) siRNA-を発現するための直鎖状DNAの、ダンベル型DNAへの変換: 18.8 マイクログラム の直鎖状 PCR 産物をそれぞれ、18.8 U のN.Bpu10I (MBI Fermentas, Hanover, MD)と混合し、反応混合物を37 度 で終夜インキュベートした。反応混合物は、95 度で1分加熱を行い、95度 から室温まで1時間かけて徐冷した。この段階で、末端ヘアピンループ構造が形成される。ヘアピン末端部分での分子内ライゲーションのために、T4 DNA リガーゼ (15,750 U) とライゲーションバッファー (TaKaRa) は反応混合物に直接加えられ、そして 16 度 で3時間インキュベートを行った。以上の変換過程はワンポット反応である点が特筆される。つまり、それら全ての過程は、たった一つのマイクロチューブ内で行われる。ライゲーション生成物は、phenol/chloroform抽出後、エタノール沈殿を行うことで得た。

試験管内での、エキソヌクレアーゼ消化によるベクターの安定性の評価

直鎖状およびダンベル型ベクターの安定性は、exonuclease III (1500 U/マイクロg of DNA, TaKaRa)で37 度、1 時間の消化を行うことで評価した。消化反応の前後の各々のフラクションを一定量用いて、それぞれ 8% ポリアクリルアミドゲル電気泳動 にて分析した。電気泳動後のゲルは、FluorImager 595 (Molecular Dynamics, Uppsala, Sweden)を用いて分析した。この装置には、アルゴンレーザー (488 nm) が励起光源



として付属しており、フルオレセイン( $\lambda_{\text{max}} = 492 \text{ nm}$ )の蛍光を検出するために、発色フィルター(around 530 nm)を用いた。次に、先ほどのゲルを用いて、ethidium bromide による染色を行った。DNA の量と, fluoresceinが付加しているかどうかは、NIH Image program と ImageQuant program (Molecular Dynamics)を用いたゲルのバンド定量することで分析した。各々のバンド強度は、標準サンプルによる標準カーブを用いて 定量化され、直鎖状DNAからダンベル型DNAへの変換効率を求めた。

#### ダンベル型ベクターのフルオレセインによる部位特異的な修飾

ダンベル型ベクターを化学修飾するため、Fluorescein Amine Labeling Kit (Panvera, Madison, WI)を添付マニュアル通りに用いた。簡潔に概略を記述すると、67 nMのダンベル型ベクター(30 マイクロリッター、100 mM phosphate buffer (pH 7.0) 溶液、4 mM succinimide ester of fluoresceinを含む)を 37 度、1 hourでインキュベーションして、その後、100 mM Tris/HCl バッファー (pH 8.0) を加えることで反応を終結させた。溶液は更に 30 分放置した。DNAは、Wizard<sup>(R)</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA)を用いることで単離した。

#### 細胞、細胞培養、形質転換、GFP蛍光アッセイ

HeLa S3/EGFP 細胞を次のようにして得た。HeLa/S3 細胞は、直鎖状に変換した pHygEGFP (Clontech, East Meadow Circle, PA)を用いて形質転換された。そして、hygromycin-耐性クローンを選び出した。細胞培養は、10% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum (FBS; GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD), hygromycin (100 マイクロg/mL; Sigma)、antibiotic-antimycotic mixture (GIBCO-BRL)を補填した Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Sigma, St. Louis, MO) を用いて行った。クローンの一つ、つまり、HeLa S3/EGFP クローン番号3 を、以下の実験に用いた。細胞は、先ほどの培地内で、37 度、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で維持された。細胞は、8-well chambered glass slide (Nalge Nunc International, Naperville, IL)内で約 40-50% confluence になるまで培養し、DNAで形質転換を行った。形質転換には、OPTI-MEM 培地 (Invitrogen, Carlsbad, CA)、Trans-It LT-1 試薬 (PanVera,

Madison, WI) を用いて、同封マニュアル通りに行った。それらは各々 100 ngの、EGFP 遺伝子をターゲットとしたsiRNAを発現させる dumbbell-shaped ベクター、直鎖状 PCR 産物ベクター、または pU6i-EGFP プラスミドベクターを用いて独立にトランスフェクションされた。DNAを用いずに、トランスフェクション試薬だけを用いたにせのトランスフェクションもコントロール実験としてなされた。トランスフェクション後の細胞のインキュベーションは48 時間なされた。トランスフェクション後24時間経った時に、培地を新鮮なものに交換した。ガラスカバースリップ上の生細胞は、48 時間後に蛍光顕微鏡 (LSM-510, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)を持ちいて観察した。

## [0058] 結果及び考察

### 合成

ダンベルづくりのキーステップは図1に示した。3段階の反応からなる。

N.Bpu10Iは、サイト&ストランド特異的な、人工的に工学的な手法で作られたエンドヌクレアーゼである。それは、2本鎖DNAの1本のストランドのみに開裂(ニック)を入れる。

図1で示したように、ステップ2でのニック酵素はDNAの一つのストランドのみを開裂する。

環化収率は90%だったことは強調できる。なぜなら環化は分子内ライゲーション反応として進行するからである。

ダンベルDNAに1箇所だけ1級アミノ基がついた化合物は蛍光性のダンベルDNAにスクシニミドエステルを用いて変換することに成功した。対照的に、一級アミノ基を持っていないダンベルは、スクシニミドエステルと全く反応しなかった。

このことは、様々な置換基がダンベルDNAのヘアピンループ領域だけに、部位特異的に導入できることを意味している。

蛍光性のダンベルDNAはまた、蛍光プライマーを用いた合成によっても作ることができた。

ダンベル型DNAは末端がヘアピンオリゴヌクレオチド構造になっているので、エキソヌクレアーゼによる分解反応に対して抵抗性を示すようになることが知られている。中間体2cと、ダンベル4dとを、独立にエキソヌクレアーゼで1時間処理し、8%PAGEで分析した。結果を図2に示したように、末端を持つDNAは1時間のヌクレアーゼ処理で完全に分解してしまったが、ダンベルは明らかに分解に抵抗性を示した。

### 細胞でのアッセイ

プラスミド、直鎖状DNAも、ダンベルDNAも、同じ発現カセットを持つ。それは、U6プロモーターとEGFPに対するsiRNA発現用遺伝子との両方である。

これら異なったsiRNA発現ベクターによる細胞内での目的mRNA遺伝子の阻害効果をテストするため、本発明者らはHela/EGFPに形質転換した。

EGFPに対するsiRNAを発現するDNAを用いたところ、特異的で効果的なターゲットへのダウンレギュレーションが確認された。

再現性は3回確認した。

本発明者らは、最高のかつ最も再現性のある阻害がダンベルDNAを使った時に確認した。

この条件下で、本発明者らはダンベルsiRNA発現ベクターが、48時間のインキュベーション後に直鎖状のPCR産物よりもより効果的であることを見つけた。

つまり、ダンベルDNAによって誘発されたRNAi効果が直鎖DNAのそれよりも高く、効果が長持ちした。

直鎖状DNAのRNAi効果が48時間後に減少したことを説明するのに、本発明者らはダンベルDNAの細胞内での寿命が、直鎖状DNAに比べて長いからだと考えている。このことは、前記のexonucleaseを用いた試験管内での実験で示されたように、ダンベルDNAが直鎖状DNAよりも、細胞の中でもexonucleaseに対してより安定に存在するからであろう。

## [実施例2]

ダンベル型DNAによって構成しうる発現型DNAの最小ユニットは、RNAポリメラーゼによって認識される配列(プロモーター)および、発現されるべきRNAをコードする配列である。細胞内に導入されるDNAは、医薬品としてのコストや細胞内への導入効率の面で、より短いものが望ましく、したがって、導入されるDNAを、より短くすることは、遺伝子の機能解析や遺伝子治療の面で非常に有益である。

### 小型化プロモーターの作製と解析

小型化プロモーターは天然のプロモーターとの比較のためにU6(90)プロモーターおよびU6(110)プロモーターを作製した。どちらも天然のU6プロモーターと比較して半分以下の長さである。このプロモーターの下流にルシフェラーゼを標的としたsiRNAをコードするDNAを配置し、ベクターを構築した。

U6(90)プロモーター配列、あるいはU6(110)プロモーター配列を有する化学合成DNAをPCRによって増幅し、EcoRIおよびBspMI処理後、piGENE-hU6ベクター(iGENE Therapeutics, Tsukuba, Japan)にプロモーターDNAを組み込んだ。これらのプロモーター配列を有するプラスミドをBspMI処理後、ルシフェラーゼ遺伝子を標的とするsiRNAをコードするDNA配列

5'-GCAGAAGCTATGAAACGATTTGCTTCCTGTCACAAATCGTTCATAGCTTC  
TGCTTTTT-3' (配列番号24)を組み込み、siRNA発現プラスミドを構築した。

ベクターDNAをHeLa細胞にトランスフェクション後、発現されるRNAの量をノーザンブロットィング法を用いて定量した。また、siRNAの効果を比較するためにルシフェラーゼの発光値を測定した。

ベクターDNAを、フルオレセイン蛍光色素を含むプライマーを用いてPCRした後に、ジギトニン処理したHeLa細胞とインキュベーション後、1時間後に蛍光を観察した。

### 結果および考察

U6(90)プロモーター、U6(110)プロモーター、および天然のU6プロモーターにおいて発現量を検出したところ、小型化によって得られたプロモーターは、天然のU6プロ

モーターとほぼ同程度で発現活性を有していた(図9(a))。また、これらのプロモーターで発現されるsiRNAはルシフェラーゼ遺伝子の発現を抑制する効果を有していた(図9(b))。さらに、蛍光色素で標識したDNAベクターの細胞核透過性を調べたところ、小型化したベクターでは、従来のベクターよりも核透過性が高いことが明らかとなった(図9(c))。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

### 産業上の利用可能性

[0059] 本発明のダンベル型DNAは、遺伝子治療に用いることができる。

### 配列表フリーテキスト

[0060] 配列番号1は、U6プロモーターの塩基配列を示す。

配列番号2は、H1プロモーターの塩基配列を示す。

配列番号3は、tRNAプロモーターの塩基配列を示す。

配列番号4は、トロンビンに対するアプタマーの塩基配列を示す。

配列番号5は、トロンビンに対するアプタマーの塩基配列を示す。

配列番号6は、トロンビンに対するアプタマーの塩基配列を示す。

配列番号7は、トロンビンに対するアプタマーの塩基配列を示す。

配列番号8は、Reactive Green 19に結合するアプタマーの塩基配列を示す。

配列番号9は、pU6i-EGFPにおけるU6プロモーター直後の挿入配列の塩基配列を示す。

配列番号10は、pU6i-laminにおけるU6プロモーター直後の挿入配列の塩基配列を示す。

配列番号11は、PCRのためのプライマーのセンス鎖の塩基配列を示す。

配列番号12は、PCRのためのプライマーのアンチセンス鎖の塩基配列を示す。

配列番号13は、oligonucleotide-capの塩基配列を示す。

配列番号14は、oligonucleotide-capの塩基配列を示す。

配列番号15は、PCRのための共通プライマーのセンス鎖の塩基配列を示す。

配列番号16は、PCRのための共通プライマーのセンス鎖の塩基配列を示す。

配列番号17は、PCRのための共通プライマーのセンス鎖の塩基配列を示す。

配列番号18は、PCRのための共通プライマーのアンチセンス鎖の塩基配列を示す。

。

配列番号19は、PCRのためのプライマーのセンス鎖の塩基配列を示す。

配列番号20は、PCRのためのプライマーのアンチセンス鎖の塩基配列を示す。

配列番号21は、siRNAをコードする直鎖状DNAの塩基配列を示す。

配列番号22は、U6(90)プロモーターの塩基配列を示す。

配列番号23は、U6(110)プロモーターの塩基配列を示す。

配列番号24は、ルシフェラーゼ遺伝子を標的とするsiRNAをコードするDNA配列を示す。

配列番号25は、U6(240)プロモーター(天然型のU6プロモーター)の塩基配列を示す。

### 請求の範囲

- [1] 直鎖状2本鎖DNAの5'末端及び3'末端の両末端において、それぞれ、センス鎖とアンチセンス鎖がループ構造の一本鎖DNAで連結されているダンベル型DNAの製造方法であって、以下の工程：
- 1) センスプライマー及びアンチセンスプライマーを用いた核酸増幅法により、鋳型DNA中の目的のDNA配列を増幅する工程、ここで、センスプライマー及びアンチセンスプライマーは、それぞれ、5'末端に下記の(a)の配列を有し、かつ、5'末端側から3'末端側の方向に向かって順に下記の(b)の配列、(c)の配列及び(d)の配列を有し、
    - (a) ニック酵素の切断認識配列のセンス配列の一部であって、ニック酵素の作用によりニックが入る部位から3'末端側の配列を含む配列
    - (b) 一本鎖でループ構造を形成することができる配列
    - (c) (a)のニック酵素の切断認識配列のアンチセンス配列の全部
    - (d) 目的のDNA配列の全部又は一部に相補的な配列
  - 2) 1)の工程で得られたDNA増幅産物を(a)のニック酵素で処理する工程、
  - 3) 2)の工程でニック酵素処理されたDNA増幅産物を加熱し、その後にアニーリングする工程、及び
  - 4) 3)の工程で加熱及びアニーリングされたDNA増幅産物をDNAリガーゼで処理する工程
- を含み、ここで、
- 1)の工程で用いられるセンスプライマー及びアンチセンスプライマーの5'末端がリン酸化されているか、あるいは1)の工程が行われた後4)の工程が行われる前にDNA増幅産物の5'末端がリン酸化される、前記方法。
- [2] ダンベル型DNAが、RNA転写のためのベクターとして用いられるものである請求項1記載の方法。
- [3] 目的のDNA配列が1個以上のプロモーター配列及びsiRNA転写配列を有する請求項1または2記載の方法。
- [4] ダンベル型DNAがタンデム型siRNA発現ベクターあるいはステムループ型siRNA

発現ベクターである請求項3記載の方法。

- [5] センスプライマー及び／又はアンチセンスプライマーが、さらに、第1のスペーサー配列及び第2のスペーサー配列を有し、ここで、第1のスペーサー配列及び第2のスペーサー配列は互いに相補的な配列であり、かつ、第1のスペーサー配列と第2のスペーサー配列とは(b)の配列を挟んで対向するように連結されている請求項1〜4のいずれかに記載の方法。
- [6] センスプライマー及びアンチセンスプライマーについて、(a)の配列が $TN^1AGG$  (配列中、Tはチミン、Aはアデニン、Gはグアニン、 $N^1$ はアデニン、シトシン、グアニンまたはチミンのいずれかである。)で表され、(b)の配列が $(T)_n$  (配列中、Tはチミンであり、nは1以上の整数である。)で表され、(c)の配列が $CCTN^{11}AGC$  (配列中、Cはシトシン、Tはチミン、Aはアデニン、Gはグアニン、 $N^{11}$ はアデニン、シトシン、グアニンまたはチミンのいずれかである。)で表される請求項1〜5のいずれかに記載の方法。
- [7] センスプライマー及びアンチセンスプライマーが、さらに、第1のスペーサー配列及び第2のスペーサー配列を有し、センスプライマーについて、第1のスペーサー配列がAGで表され、第2のスペーサー配列がTCで表され、アンチセンスプライマーについて、第1のスペーサー配列がTCで表され、第2のスペーサー配列がAGで表され、かつ、センスプライマー及びアンチセンスプライマーについて、第1のスペーサー配列と第2のスペーサー配列とは(b)の配列を挟んで対向するように連結されている請求項6記載の方法。
- [8] センスプライマーの配列及びアンチセンスプライマーについて、(b)の配列がTTTTで表される請求項7記載の方法。
- [9] センスプライマー及び／又はアンチセンスプライマーが、(b)の配列及び／又はスペーサー配列の核酸主鎖および塩基部分のうちの少なくとも1箇所で官能基により修飾されている請求項1〜8のいずれかに記載の方法。
- [10] 1)の工程の後に、官能基変換を行う工程をさらに含む請求項9記載の方法。
- [11] センスプライマー及びアンチセンスプライマーからなる少なくとも一組のプライマーを含む組成物であって、前記センスプライマー及び前記アンチセンスプライマーが、それぞれ、5'末端に下記の(a)の配列を有し、かつ、5'末端側から3'末端側の方向に向



かって順に下記の(b)の配列、(c)の配列及び(d)の配列を有する、前記組成物。

(a) ニック酵素の切断認識配列のセンス配列の一部であって、ニック酵素の作用によりニックが入る部位から3'末端側の配列を含む配列

(b) 一本鎖でループ構造を形成することができる配列

(c) (a)のニック酵素の切断認識配列のアンチセンス配列の全部

(d) 目的のDNA配列の全部又は一部に相補的な配列

[12] 直鎖状2本鎖DNAの5'末端及び3'末端の両末端において、それぞれ、センス鎖とアンチセンス鎖がループ構造の一本鎖DNAで連結されているダンベル型DNAを製造するために用いられる請求項11記載の組成物。

[13] 直鎖状2本鎖DNAの5'末端及び3'末端の両末端において、それぞれ、センス鎖とアンチセンス鎖がループ構造の一本鎖DNAで連結されているダンベル型DNAを製造するために用いられるキットであって、センスプライマー及びアンチセンスプライマーからなる少なくとも一組のプライマーを含み、前記センスプライマー及び前記アンチセンスプライマーが、それぞれ、5'末端に下記の(a)の配列を有し、かつ、5'末端側から3'末端側の方向に向かって順に下記の(b)の配列、(c)の配列及び(d)の配列を有する、前記キット。

(a) ニック酵素の切断認識配列のセンス配列の一部であって、ニック酵素の作用によりニックが入る部位から3'末端側の配列を含む配列

(b) 一本鎖でループ構造を形成することができる配列

(c) (a)のニック酵素の切断認識配列のアンチセンス配列の全部

(d) 目的のDNA配列の全部又は一部に相補的な配列

[14] 直鎖状2本鎖DNAの5'末端及び3'末端の両末端において、それぞれ、センス鎖とアンチセンス鎖がループ構造の一本鎖DNAで連結されているダンベル型DNAにデリバリー剤を結合させた核酸ベクターの製造方法であって、以下の工程：

1) センスプライマー及びアンチセンスプライマーを用いた核酸増幅法により、鋳型DNA中の目的のDNA配列を増幅する工程、ここで、センスプライマー及びアンチセンスプライマーは、それぞれ、5'末端に下記の(a)の配列を有し、かつ、5'末端側から3'末端側の方向に向かって順に下記の(b)の配列、(c)の配列及び(d)の配列を有し

、

(a) ニック酵素の切断認識配列のセンス配列の一部であって、ニック酵素の作用によりニックが入る部位から3'末端側の配列を含む配列

(b) 一本鎖でループ構造を形成することができる配列

(c) (a) のニック酵素の切断認識配列のアンチセンス配列の全部

(d) 目的のDNA配列の全部又は一部に相補的な配列

2) 1) の工程で得られたDNA増幅産物を(a) のニック酵素で処理する工程、

3) 2) の工程でニック酵素処理されたDNA増幅産物を加熱し、その後にアニーリングする工程、

4) 3) の工程で加熱及びアニーリングされたDNA増幅産物をDNAリガーゼで処理する工程、及び

5) 4) の工程でDNAリガーゼ処理されたDNA増幅産物中の目的のDNA配列以外の配列にデリバリー剤を結合させる工程

を含み、ここで、

1) の工程で用いられるセンスプライマー及びアンチセンスプライマーの5'末端がリン酸化されているか、あるいは1) の工程が行われた後4) の工程が行われる前にDNA増幅産物の5'末端がリン酸化される、前記方法。

[15] 請求項1〜10のいずれかに記載の方法で作製されたダンベル型DNA。

[16] 直鎖状2本鎖DNAの5'末端及び3'末端の両末端において、それぞれ、センス鎖とアンチセンス鎖がループ構造の一本鎖DNAで連結されているダンベル型DNAであって、以下の(a')〜(d')の配列を含む前記ダンベル型DNA。

(a') ニック酵素の切断認識配列のセンス配列の一部であって、ニック酵素の作用によりニックが入る部位から3'末端側の配列を含む配列

(b') 一本鎖でループ構造を形成することができる配列

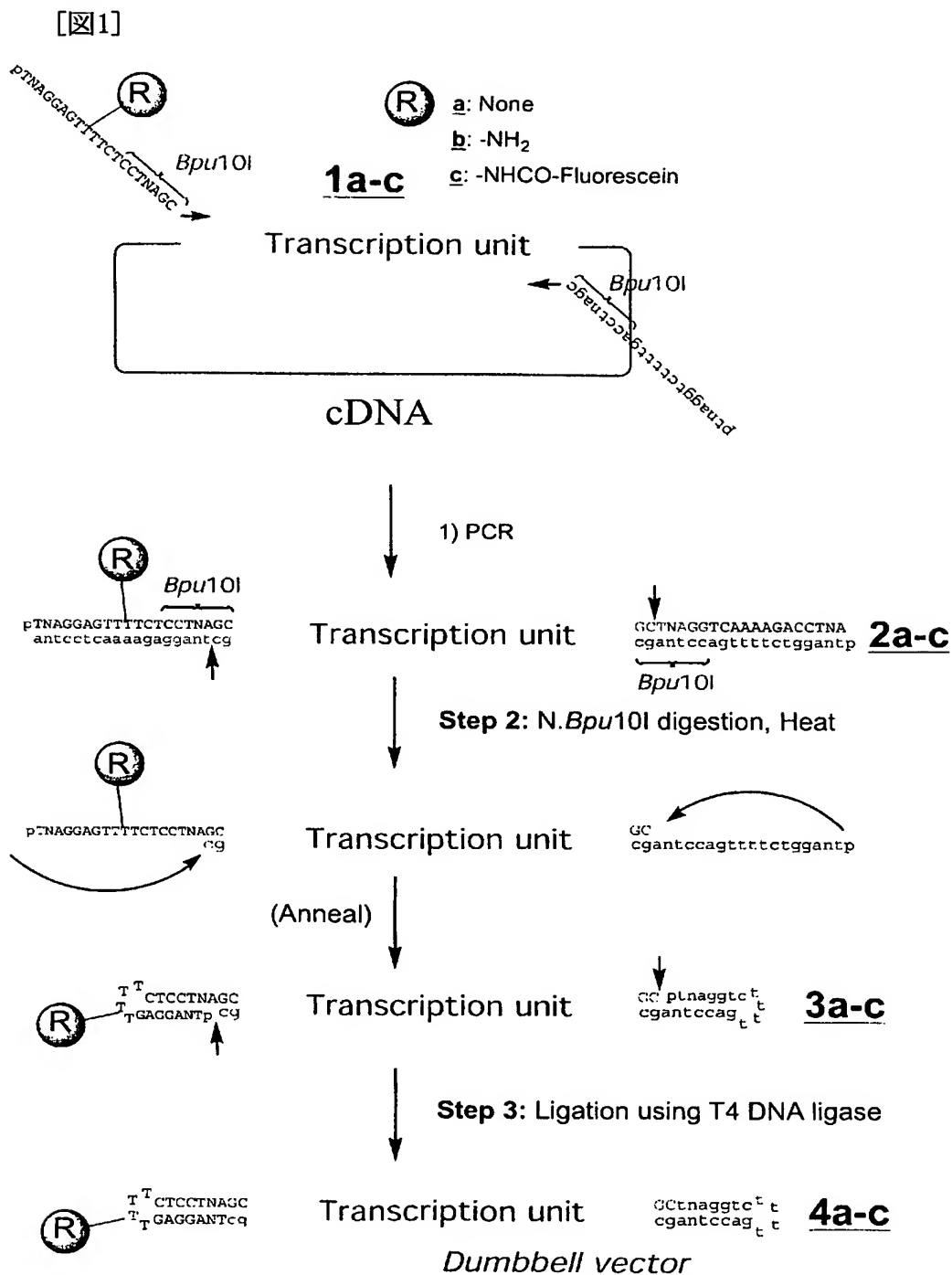
(c') (a') のニック酵素の切断認識配列のアンチセンス配列の全部

(d') 目的のDNA配列

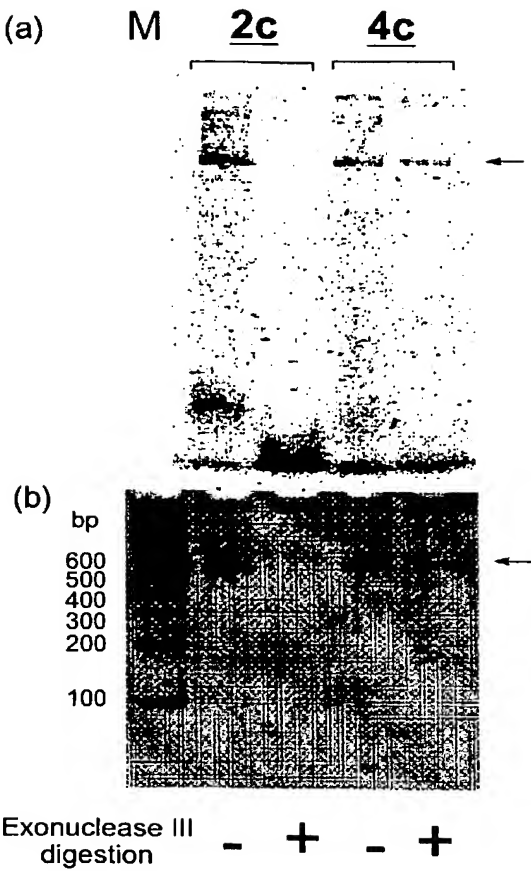
[17] 細胞あるいは組織に導入し、機能性核酸を細胞あるいは組織内で発現させることができる請求項15または16記載のダンベル型DNA。

- [18] 発現する機能性核酸がsiRNAあるいはヘアピンRNAを含む二本鎖RNAである請求項17記載のダンベル型DNA。
- [19] 発現する機能性核酸がリボザイムである請求項17に記載のダンベル型DNA。
- [20] 発現する機能性核酸がアンチセンスRNAである請求項17記載のダンベル型DNA。
- [21] RNAポリメラーゼIIIから転写されるプロモーター領域の全部又は一部を含む請求項17～20のいずれかに記載のダンベル型DNA。
- [22] RNAポリメラーゼIIIから転写されるプロモーター領域の全部又は一部が、以下の(i)～(iv)のうちの少なくとも1つの配列を含む250塩基以下の配列を含む請求項21記載のダンベル型DNA。
- (i) TATA
- (ii) CTTACCGTAACTTGAAAGT
- (iii) YYTCCCANNRTNCNNYGCRR
- (iv) ATGCAAATあるいはこれに相補的な配列
- (配列中、Rはグアニンまたはアデニンいずれかであり、Yはシトシンまたはチミンのいずれかであり、Nはグアニン、アデニン、シトシンまたはチミンのいずれかである。)
- [23] RNAポリメラーゼIIIから転写されるプロモーター領域の全部又は一部が、以下の(i')～(ii')のうちの少なくとも1つの配列を含む150塩基以下の配列を含む請求項21記載のダンベル型DNA。
- (i') RRYNNARYGG
- (ii') GGTTCGANTCC
- (配列中、Rはグアニンまたはアデニンいずれかであり、Yはシトシンまたはチミンのいずれかであり、Nはグアニン、アデニン、シトシンまたはチミンのいずれかである。)
- [24] 配列番号1、22、23または25のいずれかの配列を含む請求項21～23のいずれかに記載のダンベル型DNA。
- [25] 発現する機能性核酸の標的がウィルスあるいは癌に関連する遺伝子である請求項17～24のいずれかに記載のダンベル型DNA。
- [26] ウィルスがHIV、HCVおよびHBVからなる群より選択される請求項25記載のダンベル型DNA。

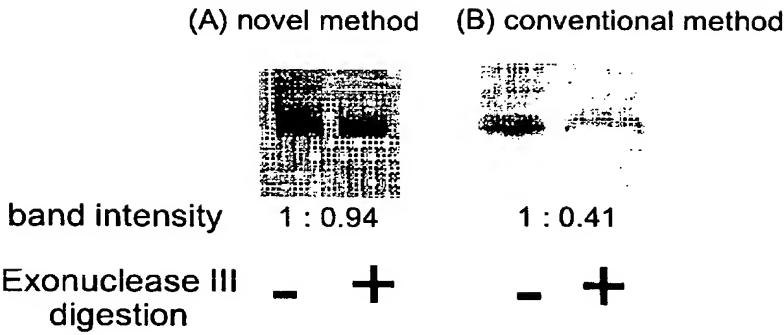
- [27] 細胞あるいは組織に導入し、遺伝子の発現を抑制することができる請求項15または16記載のダンベル型DNA。
- [28] DNAザイムである請求項27記載のダンベル型DNA。
- [29] デコイとして作用する請求項27記載のダンベル型DNA。
- [30] ダンベル型DNAが光学活性なボラノホスフェートから製造された修飾型DNAである請求項15〜29のいずれかに記載のダンベル型DNA。
- [31] 請求項15〜30のいずれかに記載のダンベル型DNAを含む組成物。
- [32] 請求項15〜30のいずれかに記載のダンベル型DNAを含む医薬組成物。



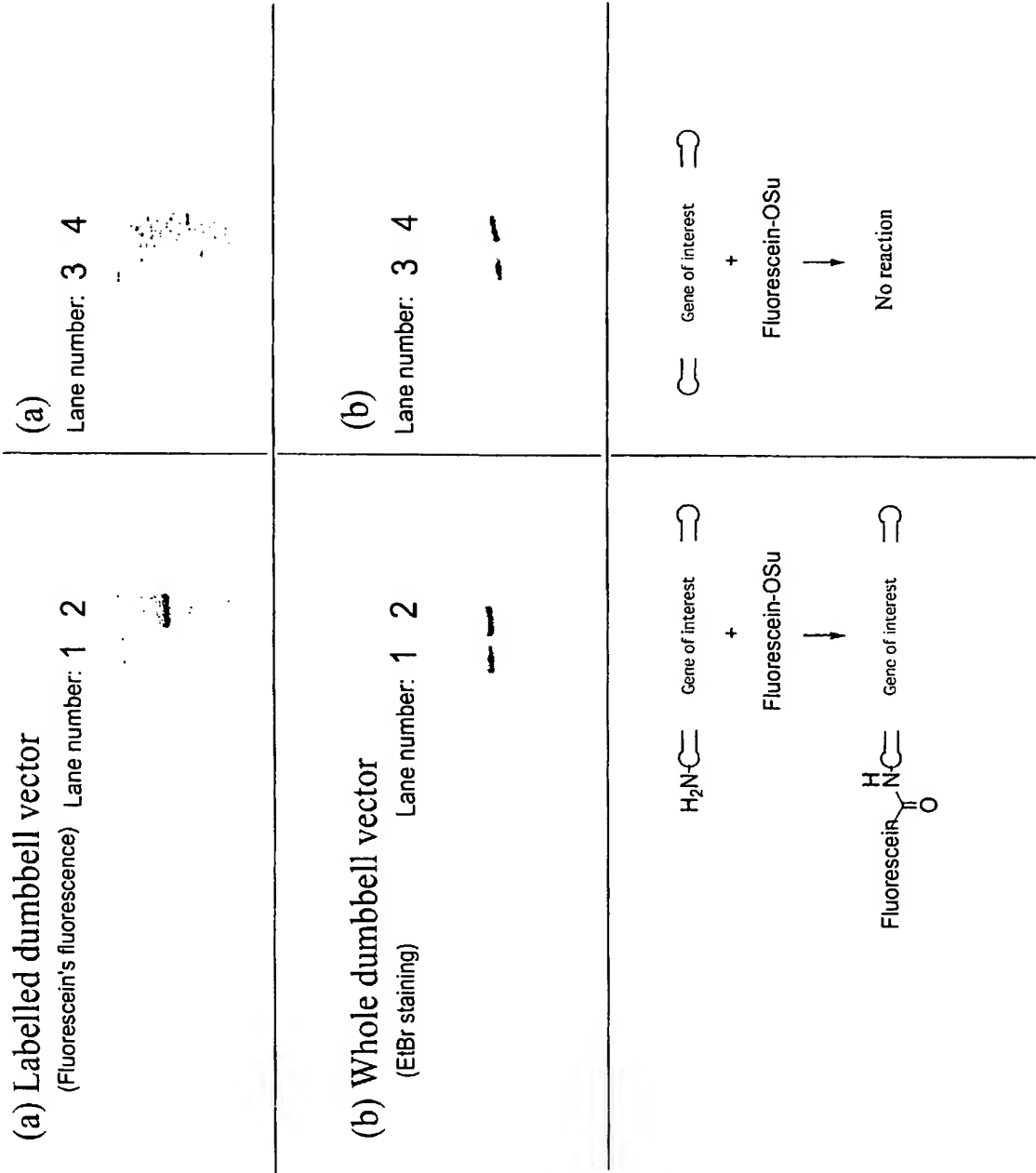
[図2]



[図3]



[図4]



[図5]

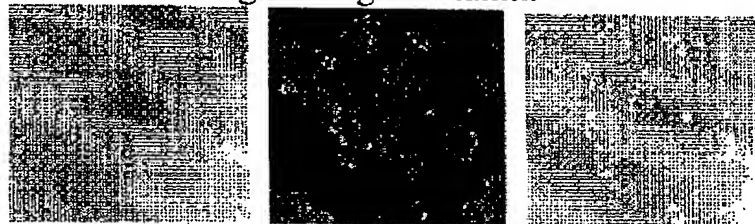
A: plasmid vector targetted against EGFP



B: no vector (mock transfection)



C: dumbbell vector targetted against lamin



D: dumbbell vector targetted against EGFP



E: linear vector targetted against EGFP



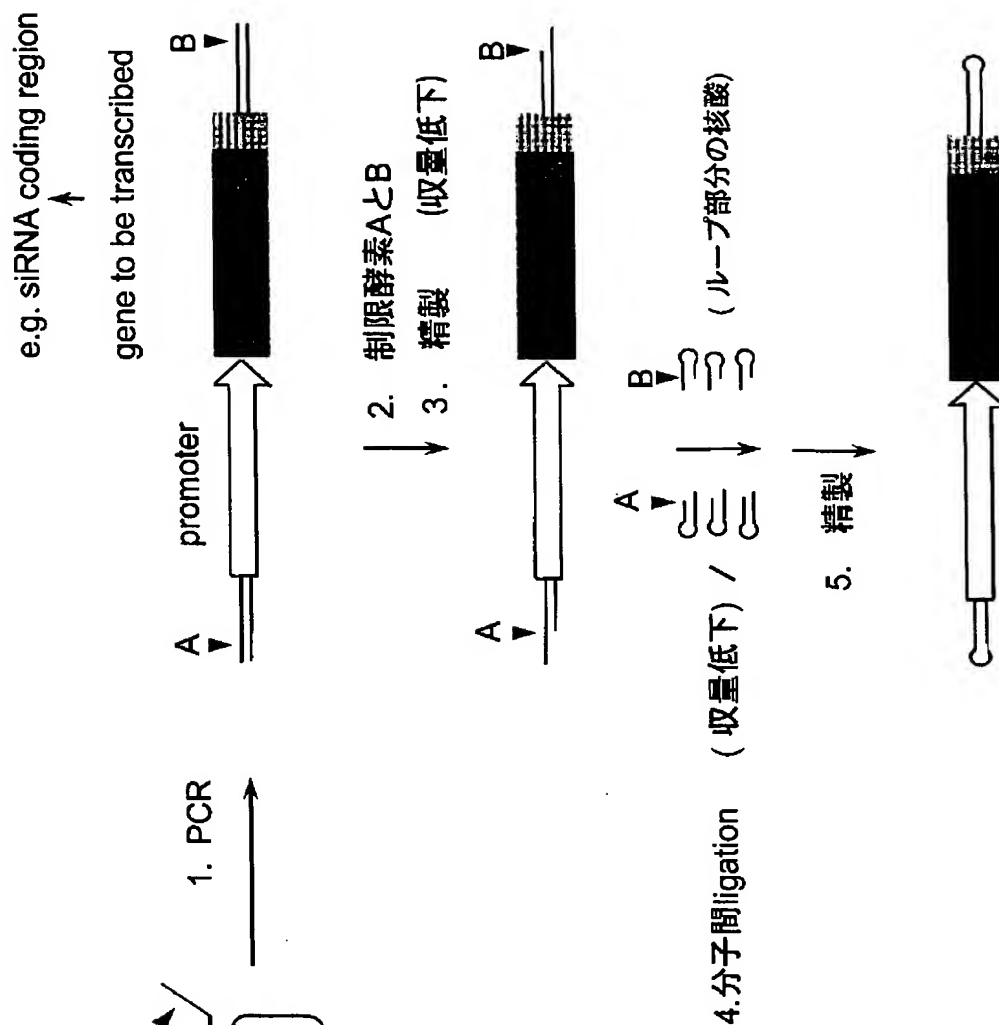
phase contrast

GFP

superposed



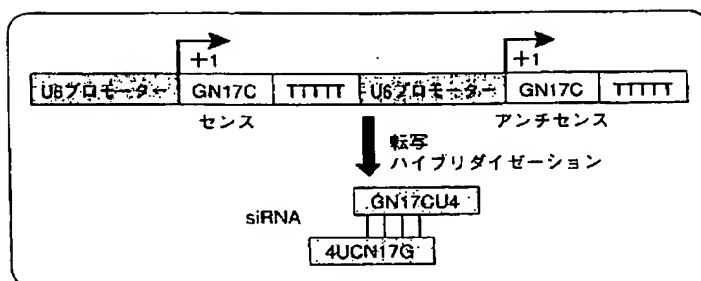
[図6]



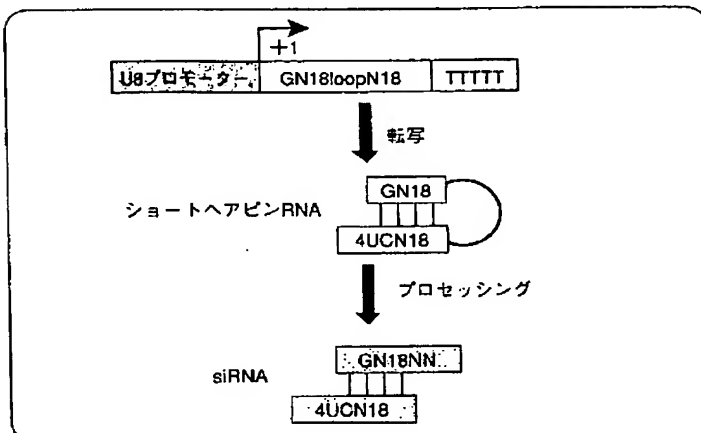


[図8]

## a) タンデムタイプ

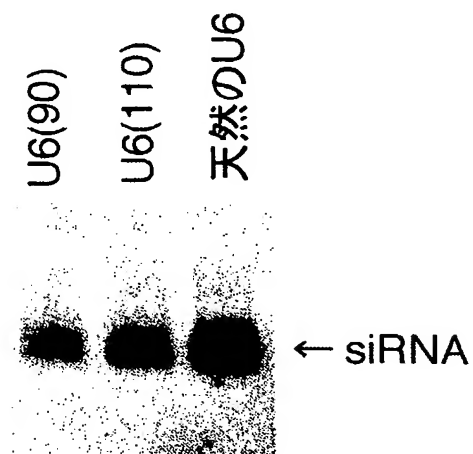


## b) ステムループタイプ

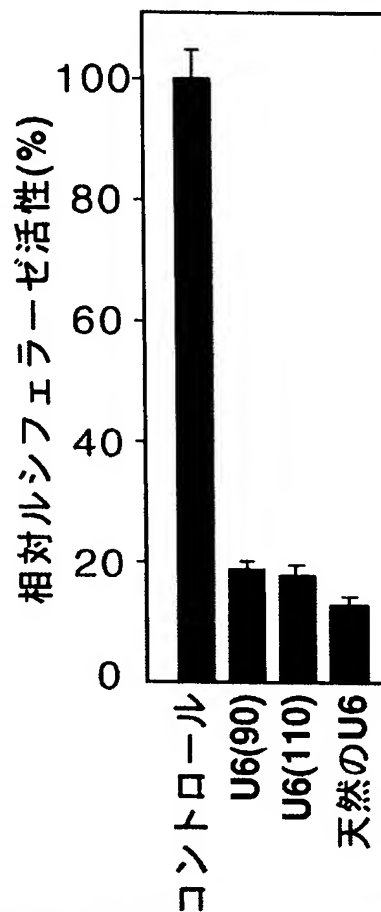


[図9]

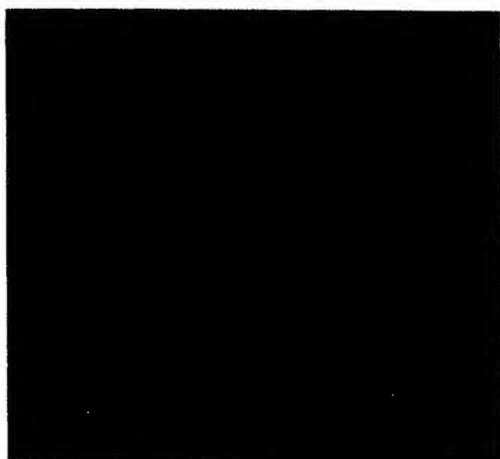
(a) 小型化プロモーターによる siRNA 発現効率



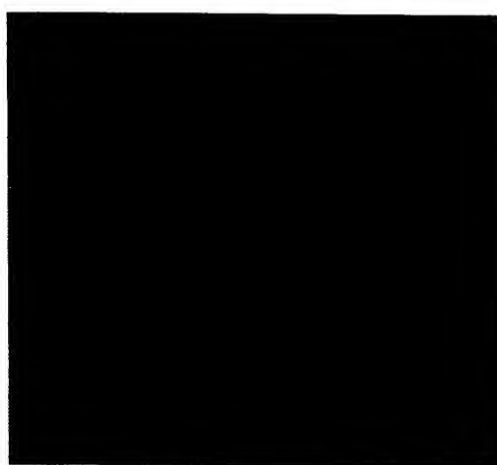
(b) 小型化プロモーターを用いた遺伝子発現抑制



(c) 小型化ベクターの細胞核透過性



U6(90)プロモーター



天然の U6 プロモーター

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/011449

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/10, C12N15/11, A61K31/711, A61K31/713

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/10, C12N15/11, A61K31/711, A61K31/713

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), JSTPLUS FILE (JOIS),  
Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	TAKI M. et al., Small-interfering-RNA expression in cells from a dumbbell-shaped DNA., Angewandte Chemie, International Edition, 2004, Vol.43, No.24, pages 3160 to 3163	1-32
P, X	TAKI M. et al., A direct and efficient synthesis method for dumbbell-shaped linear DNA using PCR in vitro., Nucleic Acid Res. Suppl., 2003, 30th, No.3, pages 191 to 192	1-32

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
15 September, 2004 (15.09.04)

Date of mailing of the international search report  
05 October, 2004 (05.10.04)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/011449

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SCHAKOWSKI F. et al., A novel minimal-size vector (MIDGE) improves transgene expression in colon carcinoma cells and avoids transfection of undesired DNA. Molecular Therapy, 2001, Vol.3, No.5, pages 793 to 800	1-32
A	US 6451563 B1 (MOLOGEN FORSCHUNGS), 17 September, 2002 (17.09.02), (Family: none)	1-32
A	SIMMEN K.A. et al., Complex requirements for RNA polymerase III transcription of the Xenopus U6 promoter. Nucleic Acids Res. 1990, Vol.18, No.19, pages 5649, 5657	21-24

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2004/011449

**Box No. I** Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

a. type of material



a sequence listing



table(s) related to the sequence listing

b. format of material



in written format



in computer readable form

c. time of filing/furnishing



contained in the international application as filed



filed together with the international application in computer readable form



furnished subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl <sup>7</sup> C12N15/10, C12N15/11, A61K31/711, A61K31/713		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl <sup>7</sup> C12N15/10, C12N15/11, A61K31/711, A61K31/713		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CA (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), JSTPLUSファイル (JOIS) Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	TAKI M. et al., Small-interfering-RNA expression in cells from a dumbbell-shaped DNA. Angewandte Chemie, International Edition, 2004, Vol. 43, No. 24, p. 3160-3163	1-32
P, X	TAKI M. et al., A direct and efficient synthesis method for dumbbell-shaped linear DNA using PCR in vitro. Nucleic Acid Res. Suppl., 2003, 30th, No. 3, p. 191-192	1-32
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 15.09.2004	国際調査報告の発送日 05.10.2004	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 佐久 敬 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4B 3037



## C (続き) . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	SCHAKOWSKI F. et al., A novel minimal-size vector (MIDGE) improves transgene expression in colon carcinoma cells and avoids transfection of undesired DNA. Molecular Therapy, 2001, Vol.3, No.5, p.793-800	1-32
A	US 6451563 B1 (MOLOGEN FORSCHUNGS) 2002.09.17 (ファミリーなし)	1-32
A	SIMMEN K.A. et al., Complex requirements for RNA polymerase III transcription of the Xenopus U6 promoter. Nucleic Acids Res. 1990, Vol.18, No.19, p.5649-5657	21-24

## 第I欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列 (第1ページの1. bの続き)

1. この国際出願で開示されかつ請求の範囲に係る発明に必要なヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下に基づき国際調査を行った。

a. タイプ ☒ 配列表

☐ 配列表に関連するテーブル

b. フォーマット ☐ 書面

☒ コンピュータ読み取り可能な形式

c. 提出時期 ☐ 出願時の国際出願に含まれる

☒ この国際出願と共にコンピュータ読み取り可能な形式により提出された

☐ 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出された

2. ☐ さらに、配列表又は配列表に関連するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見：